

抗禽流感病毒 H5N1 分泌型 IgA 在中国仓鼠卵巢细胞中的表达

李存, 张宝中, 安小平, 米志强, 刘大斌, 姜焕焕, 潘博, 王盛, 陈斌, 黄芬, 王娟, 王晓娜, 童贻刚

军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 分泌型 IgA (SIgA) 在机体的粘膜免疫中具有重要作用, 在外分泌道中比单体 IgA 和 IgG 抗体具有更好的抗感染活性。为了表达抗禽流感病毒 H5N1 人-鼠嵌合分泌型 IgA 抗体, 首先以本室先前构建的稳定表达 IgA 的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞系为基础, 共转染分泌片和 J 链表达质粒, 然后用抗生素 Zeocin 选择阳性克隆细胞, 利用倍比稀释的方法筛选分泌 SIgA 的单克隆细胞, 通过 Western blotting 分析培养上清中 SIgA 的表达情况。结果表明, 在 CHO 细胞中成功表达了 SIgA 抗体, 上述研究为研制分泌型 IgA 抗体制剂奠定了良好的基础。

关键词: 禽流感病毒 H5N1, Western blotting, SIgA 抗体

Expression of anti-avian influenza virus H5N1 secretory IgA in Chinese hamster ovary cells

Cun Li, Baozhong Zhang, Xiaoping An, Zhiqiang Mi, Dabin Liu, Huanhuan Jiang, Bo Pan, Sheng Wang, Bin Chen, Fen Huang, Juan Wang, Xiaona Wang, and Yigang Tong

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: Secretory IgA (SIgA) antibodies in external secretions play an important role in mucosal immune response. Polymeric SIgA was advantageous over monomeric IgA (mIgA) and IgG in several aspects. To express secretory IgA antibody against H5N1 virus, we constructed the secretory component and immunoglobulin J expressing plasmids and co-transfected the plasmids into the Chinese hamster ovary cells (CHO) stably expressing immunoglobulin A. Then we used Zeocin to select the positive clone cells, monoclonal cells stably secreting SIgA was screened through fold dilution method at last. The SIgA antibody secreted from the CHO cells was confirmed by Western blotting, which demonstrated that we had got the complete SIgA molecular. The successful expression of this polymeric anti-H5N1 SIgA in CHO cells will contribute to the production of recombinant SIgA as a preventive agent for infectious disease control.

Received: May 13, 2010; **Accepted:** October 20, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30872223), National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2009AA02Z111).

Corresponding author: Yigang Tong. Tel: +86-10-66948407; E-mail: tong.yigang@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 30872223), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2009AA02Z111) 资助。

Keywords: Avian influenza virus H5N1, Western blotting, secretory Immunoglobulin A

禽流感 (Avian influenza, AI) 是由甲型流感病毒引起的一种以侵害呼吸系统为主的疾病, 严重危害人类健康和畜牧业的发展, 并严重影响国家的经济发展。禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 基因组极易发生变异, 造成病毒的多型性, 给禽流感防治带来极大难度。据 WHO 最新报道, 截至 2010 年 3 月 29 日, 全世界已确诊 490 人感染 H5N1 亚型高致病性禽流感, 死亡 290 人, 病死率为 59.2%^[1]。WHO 预测下一次流感大流行不是有和无的问题, 而是早和晚的问题。为此, 发展人禽流感阻断技术, 进行人禽流感的综合防控, 成为世界各国的迫切需求。

在预防方面, 使用疫苗进行主动免疫预防是一种较为理想的选择, 但是目前人用禽流感疫苗上存在一些问题。由于目前尚没有禽流感在人群中流行, 因此疫苗保护效果难以准确评价。使用疫苗进行预防还有一个很大的缺点, 那就是从疫苗注射到产生保护性抗体需要数周的时间, 这往往会影响预防效果, 尤其是对一些高危人群, 不能提供紧急防护, 一旦疫情发生, 有可能造成大量生命损失。抗体制剂作为一种被动免疫防护手段, 可以弥补疫苗的不足, 可以在使用之后立刻产生防护效果, 尤其适合于重点人群的紧急保护。

分泌型 IgA 是 20 世纪 60 年代初在外分泌液中发现的一种 IgA 抗体, 主要存在于乳汁、胃肠液、呼吸道分泌液等外分泌液中。SIgA 分子是由 2 个 IgA 单体 (每个单体含 2 条轻链和 2 条重链)、1 条 J 链和 1 条分泌片 (Secretory component, SC, 为多聚免疫球蛋白受体 pIgR 的胞外裂解片段) 构成的异源十聚体 (图 1)^[2]。

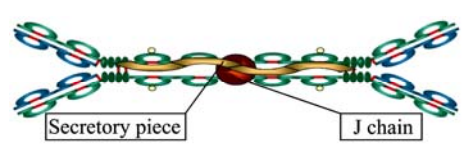


图 1 SIgA 多肽链示意图
Fig. 1 Diagram of SIgA polypeptide chain.

与普通的抗体分子相比 SIgA 具有许多优良特性: SIgA 分子中的 J 链将 2 个 IgA 单体连接起来, 由于每个 IgA 单体具有 2 个抗原结合部位, 因此每个 SIgA 抗体即有 4 个抗原结合位点 (四价), 从而比普通抗体分子具有更高的亲和力^[3]。SIgA 具有很高的稳定性, 其在粘膜表面的半衰期为 IgG 的 3 倍, 其在人体外分泌道中的保护作用可以持续 4 个月以上^[3]。分泌片的存在还赋予 SIgA 特殊的免疫保护作用: 首先, 分泌片具有非特异性的病原微生物中和活性^[4]; 其次, 分泌片上的糖基粘附于粘膜上皮更使 SIgA 整齐地排列在粘膜表面, 形成隔离保护层, 可有效地阻止病毒的入侵^[5]。因此, 研究呼吸道或消化道分泌型 IgA 对禽流感病感染的阻断作用, 具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞及主要试剂

DNA 工具酶购自 Promega 公司; LipofectiAMINETM²⁰⁰⁰ Regent 购自 Gibco BRL 公司; Zeocin 抗生素购自 Invitrogen 公司; DMEM 购自 Hyclone 公司; 透析胎牛血清购自 Bioind 公司; 本研究使用的抗体均购自 Sigma 公司; protein A-agarose 购自 Invitrogen 公司; 实验中所用的抗禽流感病毒 H5N1 HA 的嵌合 IgA 稳定表达单克隆细胞系已由本实验室构建完成^[8]; 实验所设计的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 合成引物序列

Table 1 Primer Sequence	
Primer	Sequence (5'-3')
pCDNA-SC-F	TAGACGGTGTGCGCCGCTGCT
PCDNA-SC-R	CTCTGCAAAAAGCCTGGGATCCT
J-F	TGACGTCAATGACGGTAAATG
Jnei-R	CATCTTCTTGGGCTTTCACAT
SC-F	CGTGTACGGTGGGAGGTCTATA
SCnei-R	GACAGAGGTGGGTGGGTAGTA

1.2 人-鼠嵌合 SIgA 抗体表达质粒的构建

1.2.1 人-鼠嵌合 SIgA 抗体分泌片 SC 表达质粒的构建

本实验室通过 DNA 剪接技术克隆得到了免疫球蛋白受体 (pIgR) 基因, 但获得的 pGEM-T-pIgR 的克隆中有部分突变 (融合引物内)^[6], 为了获得野生型的基因序列, 选择 pGEM-T-pIgR 1 号和 2 号 2 个克隆 (克隆 1 目的基因 3'端有突变, 克隆 2

目的基因 5'端有突变), 再加上 pUC19, 通过构建辅助质粒和中间质粒, 利用“全长质粒快速定点突变技术”^[7]完成重组质粒 pcDNA4-pIgR 的构建 (图 2)。

以 *EcoR* I / *Bam*H I 双酶切 pGEM-T-pIgR-1, 回收约 1 000 bp DNA 片段, 同时以 *Bam*H I / *Kpn* I 双酶切 pGEM-T-pIgR-2, 回收约 500 bp DNA 片段, 将上述回收的 2 条 DNA 条带插入到以 *EcoR* I / *Kpn* I

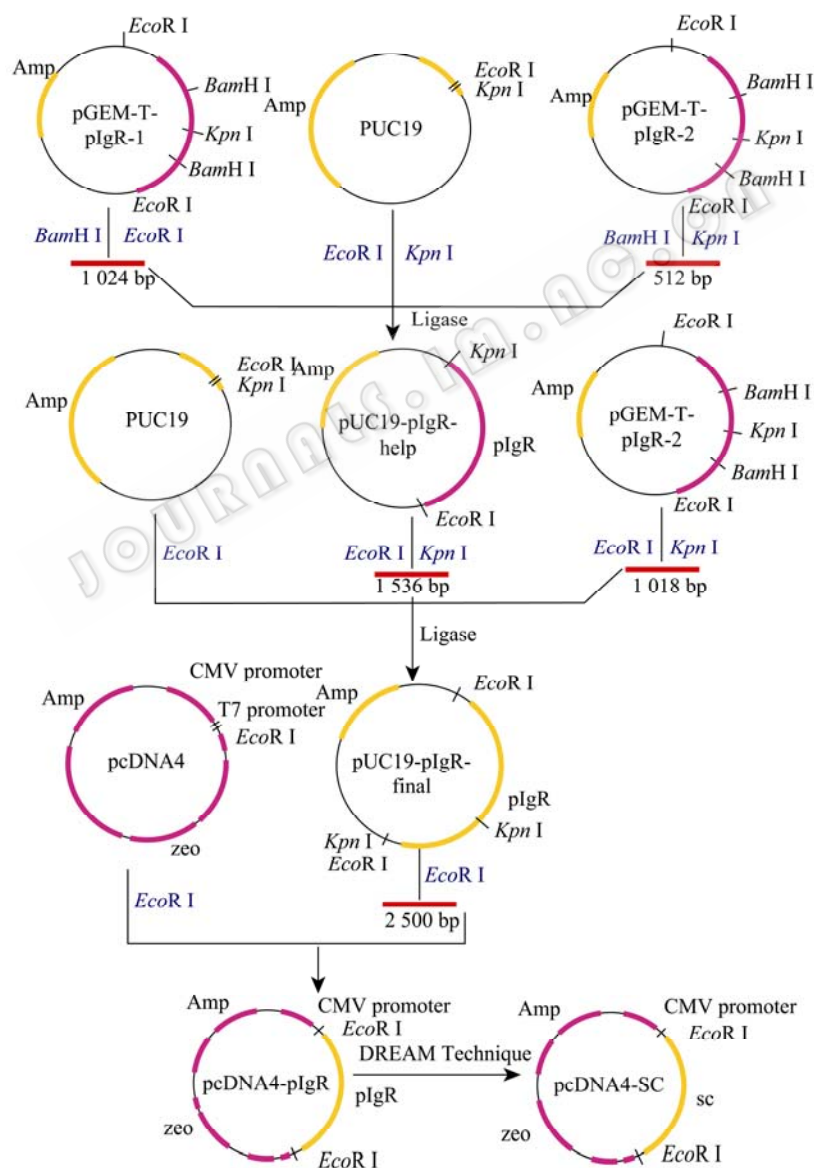


图 2 pcDNA4-SC 构建过程示意图

Fig. 2 Construction of SC expression plasmid.

双酶切的 pUC19 载体中, 形成辅助质粒 pUC19-pIgR-help; 第二步将辅助质粒 pUC19-pIgR-help 进行 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切, 回收纯化约 1 500 bp 的 DNA 条带, 同时以 *EcoR* I / *Kpn* I 双酶切 pGEM-T-pIgR-1, 回收纯化约 1 000 bp 的 DNA 条带, 将上述回收的 2 条 DNA 条带插入到经 *EcoR* I 消化的 pUC19 载体中, 形成中间质粒 pUC19-pIgR-final; 最后将中间质粒 pUC19-pIgR-final 使用 *EcoR* I 消化, 回收完整 *pIgR* 基因的 2 500 bp DNA 条带, 与以 *EcoR* I 酶切的哺乳动物表达载体 pcDNA4/His A 连接, 完成人 *pIgR* 基因的真核表达质粒 pcDNA4-pIgR 的构建。

利用本实验室建立的“全长质粒快速定点突变技术”^[7], 将 pcDNA4-pIgR 质粒 *pIgR* 基因胞内区基因部分突变, 从而完成 *pIgR* 胞外区基因载体的构建。具体方法: 设计 2 条突变引物 pCDNA-SC-F 和 pCDNA-SC-R (表 1); 用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶做标准的 PCR 反应, 50 μ L 体系含有 10 μ L 5 \times GC Buffer(含 $MgCl_2$), 4 μ L dNTPs (各 2.5 mmol/L), 引物 pCDNA-SC-F 和 pCDNA-SC-R (10 μ mol/L 各 1 μ L, 0.2 μ L pcDNA4-pIgR(10 ng) 作为 PCR 反应的模板, 0.5 μ L (2 U/ μ L) Phusion 超保真 DNA 聚合酶, 用去离子水补至 50 μ L。将配好的 PCR 反应体系放入 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer, FosterCity, CA) 中进行扩增, 反应条件为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 变性 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将上述 PCR 产物纯化并进行磷酸化, 然后放入 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中 30 min; 最后 70 $^{\circ}$ C 加热 5 min 将 T4 多聚核苷酸激酶灭活; 磷酸化的 PCR 产物进行自连, 转化感受态细胞, 摇菌提取质粒进行酶切鉴定及测序鉴定, 突变后的质粒命名为 pcDNA4-SC。

1.2.2 人-鼠嵌合 SIgA 抗体 IgJ 表达质粒的构建

与 SC 基因的扩增方法相同, 我们也是利用 DNA 剪接技术克隆得到了 *IgJ* 基因, 并将其克隆到了 PGEM-T-Easy 克隆载体上^[6]。以 *Hind* III/*EcoR* I 双

酶切 PGEM-T-Easy-IgJ, 回收约 700 bp *IgJ* 基因片段, 插入以 *Hind* III/*EcoR* I 双酶切的哺乳动物表达载体 pcDNA4/His A 中, 得到人 *IgJ* 基因的哺乳细胞表达质粒 pcDNA4-IgJ (图 3)。

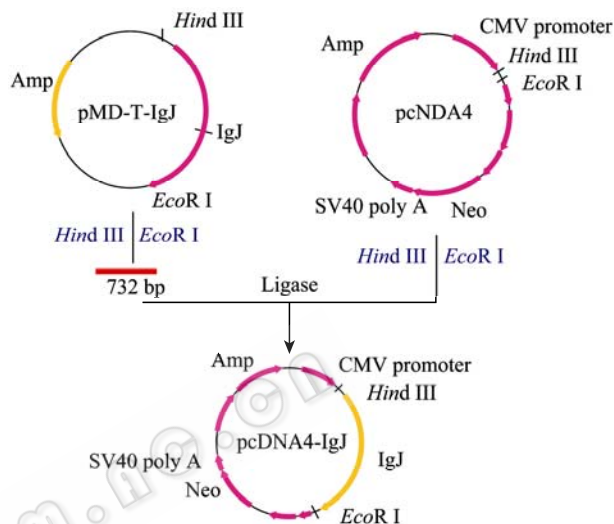


图 3 重组质粒 pcDNA3.1-IgJ 构建示意图

Fig. 3 Construction of IgJ expression plasmid.

1.3 嵌合 IgA CHO 单克隆细胞系的再转染及阳性克隆的筛选

本实验室已成功构建了稳定表达 IgA 的 CHO 单克隆细胞系^[8], 在此基础上我们再共转染 SC 和 IgJ 表达质粒。取 pcDNA4-SC、pcDNA4-IgJ 各 2 μ g 加到 100 μ L 无血清和无抗生素培养液 DMEM 中, 取 LipofectiAMINETM²⁰⁰⁰ 4 μ L 加到 100 μ L 无血清和抗生素的培养液, 室温孵育 5 min, 将二者混合, 室温放置 20 min。静置期间, 每次用无血清和抗生素的 DMEM 培养液 1 mL 洗涤细胞 2 次, 最后加 0.2 mL 的无血清和双抗的 DMEM 培养液到六孔板细胞中。将 LipofectiAMINETM²⁰⁰⁰ 和 DNA 的混合物滴加到培养板。于 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 6 h, 吸弃上清, 加入含 10% 透析胎牛血清的培养液培养 48 h, 然后用含 500 μ g/mL zeocin 抗生素的培养液进行克隆化培养, 通过 96 孔板倍比稀释的方法筛选单克隆细胞系。

1.4 嵌合分泌型 IgA 单克隆细胞系的 PCR 鉴定

将筛选得到的单克隆细胞系提取全基因组 DNA, 进行 PCR 反应, 鉴定 SC 基因和 IgJ 基因是否已与 CHO⁻细胞基因组发生重组。用 J-F、Jnei-R 和 SC-F、SCnei-R 分别扩增 IgJ 基因和 SC 基因, 具体体系如下: 5×FastPfu Buffer 5 μL; dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μL, J-F、Jnei-R (10 μmol/L) (或 SC-F、SCnei-R); FastPfu (2.5 U/μL) 0.5 μL; 用水补至 25 μL。按以下条件进行 PCR 反应: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 20 s, 51 °C (SC 57 °C) 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 再延伸 5 min, 将扩增的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。

1.5 嵌合分泌型 IgA 单克隆细胞系的无血清培养

将 SIgA 单克隆细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养, 等其生长至 G1 期更换为 DMEM 无血清培养, 72 h 后收集无血清上清, 然后进行免疫沉淀和 Western blotting 分析。

1.6 免疫沉淀实验

每毫升 SIgA 样品加入 50 μL 兔抗人的 IgA (α) 4 °C 孵育过夜, 然后加入 50 μL protein A-agarose 4 °C 孵育 4 h, 5 000 r/min 离心 10 min 后小心弃上清, 加入 60 μL SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 最后进行 Western blotting 分析。

1.7 嵌合分泌型 IgA 抗体的 Western blotting 分析

1.7.1 还原 SDS-PAGE 分析

免疫沉淀的蛋白样品进行还原 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 上, 分别对 SIgA 的 4 个多肽链进行检测, 一抗分别为鼠抗人 Kappa 链 (1:1 500)、α 链 (1:2 000)、SC (1:2 000) 和 IgJ (1:2 000) 的单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000), 以 ECL 显色。

1.7.2 非还原 SDS-PAGE 分析

免疫沉淀的蛋白样品进行非还原 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 上, 然后利用鼠抗人的 SC (1:3 000) 单克隆抗体进行 Western blotting 检测, 二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 500), 以 ECL 显色。Western blotting 印

迹操作详见参考文献[9]。

2 结果与分析

2.1 人-鼠嵌合 SIgA 抗体分泌片 SC 表达质粒的构建

通过“全长质粒快速定点突变技术”, 该方法是利用 PCR 一步定点突变, 以 pcDNA4-pIgR 为模板, 使用高保真的 DNA 聚合酶扩增全长质粒, 并将目的基因 pIgR 胞内区部分突变, PCR 产物磷酸化、自连、转化最终筛选阳性克隆 pcDNA4-SC。用 PVU II 消化 pcDNA4-SC, 产生 3 378 bp、1 748 bp、1 275 bp 和 699 bp 四条 DNA 条带 (图 4), 测序表明成功获得目标序列。

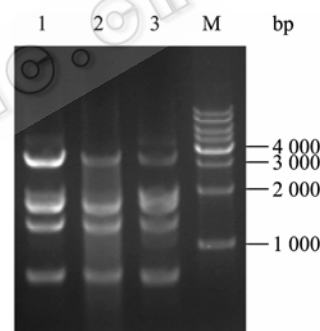


图 4 SC 表达质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction of SC expression plasmid. 1, 2, 3: SC expression plasmid; M: DNA molecular weight marker 1 kb ladders.

2.2 人-鼠嵌合 SIgA 抗体 IgJ 表达质粒的构建

通过 Hind III 和 EcoR I 双酶切 PGEM-T-Easy-IgJ, 回收 IgJ 基因片段, 插入以 Hind III 和 EcoR I 双酶切的哺乳动物表达载体 pcDNA4/His A 中, 构建了质粒 pcDNA4-IgJ。该重组质粒经 Nco I 酶切鉴定, 产生 3 443 bp、2 042 bp 和 220 bp 三条 DNA 条带 (图 5); 进一步对该克隆的测序鉴定, 说明成功插入目的基因。

2.3 嵌合分泌型 IgA 单克隆细胞系的 PCR 鉴定

将筛选得到的 SIgA 单克隆细胞系提取全基因组 DNA, 利用载体和 IgJ 基因、SC 基因内部特异引物进行 PCR 反应, 扩增分别得到 445 bp 和 566 bp 的目的片段 (图 6、图 7), 证明 IgJ 基因、SC 基因已整合到 CHO 细胞基因组中。

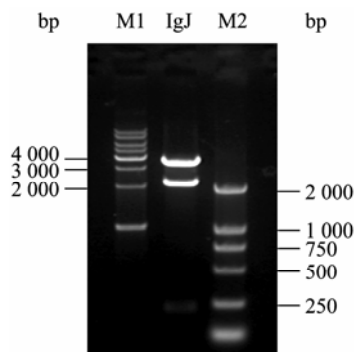


图5 IgJ 表达质粒的酶切鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant IgJ expression plasmid. IgJ: IgJ expression plasmid. M1: DNA molecular weight marker 1 kb ladders; M2: DNA molecular weight marker DL2000Plus.

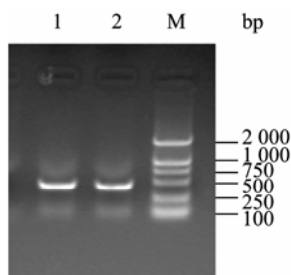


图6 SC 基因的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR analysis of SC gene. 1,2: PCR product of SC gene. M: DNA molecular weight marker DL2000Plus.

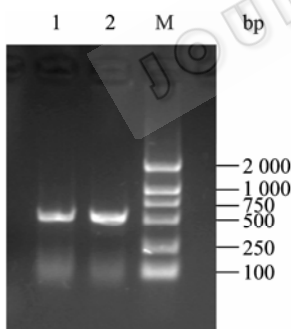


图7 IgJ 基因的 PCR 鉴定

Fig. 7 PCR analysis of IgJ gene. 1,2: PCR product of IgJ gene. M: DNA molecular weight marker DL2000Plus.

2.4 嵌合分泌型 IgA 抗体的 Western blotting 分析

2.4.1 还原 SDS-PAGE 分析

免疫沉淀得到的 SIgA 蛋白样品进行还原 SDS-PAGE 电泳后, 转移到 PVDF 膜上做 Western blotting 分析, 结果显示 SIgA 中包括重链 (55 kDa)、轻链 (25 kDa)、SC (66 kDa) 和 IgJ (17 kDa) 四种多肽链大小与阳性对照 (唾液, saliva) 一致 (图 8)。

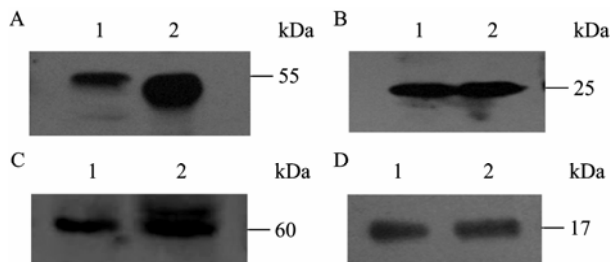


图8 重组 SIgA 抗体 Western blotting 鉴定

Fig. 8 Western blotting analysis of recombinant SIgA. (A) Heavy chain. 1: positive control (saliva); 2: SIgA immunoprecipitation. (B) Kappa light chain. 1: SIgA immunoprecipitation; 2: positive control. (C) SC. 1: SIgA immunoprecipitation; 2: positive control (saliva IP). (D) IgJ. 1: SIgA immunoprecipitation; 2: positive control.

2.4.2 非还原 SDS-PAGE 分析

免疫沉淀得到的 SIgA 蛋白样品进行非还原 SDS-PAGE 电泳后, 转移到 PVDF 膜上做 Western blotting 分析, 一抗为鼠抗人 SC (1:3 000) 的单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000), 经 ECL 发光显示出 3 条大小约为 66 kDa (SC)、160 kDa、400 kDa (SIgA 全分子) 的条带, 与阳性对照 (唾液, saliva) 一致 (图 9), 证明我们成功表达出了具有十聚体形式的 SIgA 抗体分子。

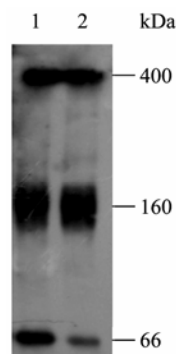


图9 重组 SIgA 抗体非还原 Western blotting 鉴定

Fig. 9 Western blotting analysis of recombinant SIgA under nonreducing conditions. 1: SIgA immunoprecipitation; 2: positive (saliva).

3 讨论

由于禽流感是一种呼吸道传染病, 其感染途径主要是呼吸道或消化道, 通过粘膜侵入, 因此在病

病毒感染发生的最早阶段采取措施, 极可能最有效地抵抗病毒的感染, 用最少的药物达到最大的效果。SIgA 是外分泌液中存在的一种主要抗体, 是呼吸道、消化道、泌尿生殖道和乳汁中抵御病原体及有害物质的第一道免疫防线, 是机体粘膜免疫最重要的抗体, 具有很强的抗感染能力^[10]。分泌型 IgA 通过滴鼻/喷雾或口服/灌胃即可给药, 无需注射, 这样的用药方式更加安全和方便。而且因为是局部使用, 使用剂量较小, 成本较低。

抗体的高效表达技术是抗体工程研究的一个关键技术, 提高单个细胞单位时间抗体表达量和提高发酵体积和细胞密度是提高抗体表达量的 2 个关键的步骤和因素, 同时也是 2 个相互关联和相互影响的环节, 优化系统提高抗体产量是一个极其复杂的系统工程, 不仅要考虑基因的选择、载体的构建、基因整合的位置、表达调控序列的功能, 而且要考虑细胞的生长速度、抗凋亡能力、生存活力、代谢特性、营养状况等复杂因素。通过借鉴国外先进的抗体高效表达经验, 我们将采用强启动子、绝缘子、优化密码子、抗凋亡、促进蛋白质折叠、改善细胞代谢状况等措施提高抗体表达量, 这将是我们的下一步的主要工作内容。

本研究构建了稳定表达和分泌 SIgA 的 CHO 细胞系, 并通过 PCR 和 Western blotting 分析, 检测到本实验室构建的 SIgA 稳定 CHO 细胞系表达的 SIgA 由重链、轻链、分泌片和 J 链构成, 能稳定分泌嵌合 SIgA, 而且表达的重链、轻链、J 链、分泌片与天然 SIgA 大小一致, 为进一步建立高效表达 SIgA 抗体的细胞系和开发出针对 H5N1 高致病性禽流感的预防性 SIgA 抗体制剂奠定了基础。

REFERENCES

- [1] WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_03_29/en/index.html, 2010.

- [2] Corthésy B. Recombinant immunoglobulin A: powerful tools for fundamental and applied research. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(2): 65-71.
- [3] Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*, 1998, 4(5): 601-606.
- [4] Dallas SD, Rolfe RD. Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. *J Med Microbiol*, 1998, 47(10): 879-888.
- [5] Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, et al. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion *in vivo*. *Immunity*, 2002, 17(1): 107-115.
- [6] Zhang BZ, An XP, Zhang X, et al. Cloning of genes by genomic DNA splicing for secretory IgA production. *China Biotechnol*, 2008, 28(6): 1-6.
- 张宝中, 安小平, 张昕, 等. 用基因组 DNA 剪接技术克隆 SIgA 相关基因. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(6): 1-6.
- [7] Zhang BZ, Ran DL, Zhang X, et al. Rapid site-directed mutagenesis on full-length plasmid DNA by using designed restriction enzyme assisted mutagenesis. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 306-312.
- 张宝中, 冉多良, 张昕, 等. 用 DREAM 技术进行全长质粒快速定点突变. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 306-312.
- [8] Zhang BZ, Zhang X, Chen WR, et al. Construction of anti-H5N1 virus chimeric IgA antibody gene and its expression in CHO cells. *Chin J Biotech*, 2009, 25(5): 714-719.
- 张宝中, 张昕, 陈万荣, 等. 抗 H5N1 病毒嵌合 IgA 抗体基因的构建及其在 CHO 细胞中的表达. *生物工程学报*, 2009, 25(5): 714-719.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880-897.
- [10] Hammarström L, Weiner CK. Targeted antibodies in dairy-based products. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 606: 321-343.