

抗人红细胞单链抗体与狂犬病毒 G 蛋白双功能融合蛋白的构建及生物学活性检测*

周松峰¹, 廖文军², 覃绍敏¹, 袁书智², 白安斌¹, 吴健敏¹

摘要:目的 为构建具有凝集性、免疫反应性的双功能融合蛋白。**方法** 本研究利用特异性引物从重组质粒 pMD-2E8scFv 和 pMD-G 中以 PCR 方法扩增 2E8 基因(抗人红细胞 H 抗原单链抗体基因)和 Kg 基因(狂犬病毒 G 基因主要抗原表位区),采用重叠延伸(SOE)PCR 法拼接成融合基因 2E8Kg,构建原核表达质粒 pET-Trx-2E8Kg 并将其转化至 BL21(DE3)pLysS 中进行诱导表达并对诱导菌液进行 SDS-PAGE 分析。**结果** 2E8Kg 融合基因获得了高效表达并主要以包涵体形式存在,表达量占菌体总蛋白的 23.5% 左右,分子量约为 77.7kD,与预期的大小一致。将表达的蛋白以亲和层析法进行纯化并通过谷胱甘肽还原法进行复性,纯化后蛋白纯度达到 98.9%。**结论** 经 Western-blot 检测和红细胞凝集试验证明,2E8kg 融合蛋白既能够与狂犬病毒(RV)高免血清发生特异性反应,又能够与人红细胞结合,具有双功能特性。

关键词:狂犬病毒;G 基因;单链抗体;双功能融合蛋白;原核表达

中图分类号:R373

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2012)06-0597-05

Construction and bioactivity detection on bifunctional fusion protein of anti-human red blood cell scFv and RV G

ZHOU Song-feng¹, LIAO Wen-jun², QIN Shao-min¹, YUAN Shu-zhi², BAI An-bin¹, WU Jian-min¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Animal Vaccines and New Technology, Guangxi

Veterinary Research Institute, Nanning 530001, China;

2. Beijing Blood Biotech Co. Ltd., Beijing 100850, China)

ABSTRACT: The purpose of this study is to construct fusion proteins that can generate agglutination and immune reaction. Specific primers were used to amplify, from the recombinant plasmids of both pMD-2E8scFv pMD-G with PCR, 2E8 gene (scFv gene against H antigen of human erythrocytes) and Kg gene (the major antigen epitope domain of G gene). These two were thereupon spliced into a fusion gene by splicing overlap extension PCR to construct prokaryotic expression plasmid pET-Trx-2E8Kg, and was then transformed into competent cell BL21(DE3)pLysS. Finally, protein expression was induced with IPTG and analysed by SDS-PAGE. The results showed that the target fusion protein was successfully expressed and identified in inclusion bodies, with an expression accounting for 23.5% of the total bacterial protein. The molecular weight was 77.7 kD, consistent with the expected size. The purity of the expressed protein reached 98.9% after being purified by affinity chromatography and refolded by Glutathione reduction. The results of Western-blot detection and agglutination test on red blood cell indicated that the fusion protein 2E8kg had bifunctional characteristics, not only being able to have specific reaction with anti-rabies hyperimmune serum, but also could combine with human red blood cell.

KEY WORDS: rabies virus (RV); G gene; scFv; bifunctional fusion protein; prokaryotic expression

This study was supported by the Special Fund of Basic Research and Operation in Science and Technology Department of Guangxi Province (No. 11-4).

Corresponding author: WU Jian-min, Email:wu-jm20@163.com

* 广西科技厅基本科研业务费专项(桂科专项 11-4)

通讯作者:吴健敏,Email:wu-jm20@163.com

作者单位:1. 广西兽医研究所 广西畜禽疫苗重点实验室, 南宁 530001;

2. 北京博莱得利生物技术有限责任公司,北京 100850

狂犬病是由狂犬病病毒(rabies virus, RV)引起的中枢神经系统感染的急性人畜共患传染病。所有温血动物都可感染,狂犬病一旦发病,病死率几乎 100%^[1],是人类病死率最高的急性传染病之一。狂

犬狂犬病毒 G 基因编码的糖蛋白(glycoprotein, GP)是病毒唯一暴露在表面的蛋白^[2], 是唯一能刺激机体产生中和抗体的病毒蛋白^[3], 在狂犬病毒致病和免疫中起着关键作用^[4]。

狂犬病的诊断方法目前主要有中和试验、免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验(ELISA)、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)等, 但这些检测方法对仪器和专业人员的依赖性较高, 检测成本昂贵, 且耗时相对较长, 极大的限制了它们在基层单位的应用, 由于我国面积辽阔, 农村散养犬较多, 在开展 RV 的监测及免疫效果评估时, 急需建立一种快速、敏感、稳定, 可以现场使用的检测方法。

近年来来自体红细胞凝集试验发展迅速^[5], 已在多个检测领域得到应用^[6-7]。该方法的基本原理是: 以红细胞作为指示细胞, 利用基因工程方法构建一种重组双功能融合蛋白(目标抗原或抗体与红细胞非凝集型抗体^[8]联结而形成的抗原-抗体或抗体-抗体结合物), 该融合蛋白既能与红细胞结合又能与被检抗体/抗原结合, 通过样品中被检抗体/抗原的桥联作用, 使指示红细胞发生凝集, 根据指示红细胞的凝集现象达到快速检测的目的。

本实验室利用该技术成功建立了检测猪瘟、猪伪狂犬病毒的红细胞凝集试验^[9-10]。因此本试验拟在此基础上利用(SOE) PCR 技术, 将狂犬病毒 G 基因主要抗原表位区 kg 与抗人红细胞 H 抗原单链抗体 2E8scFv^[11]拼接成双功能融合基因, 进行表达复性并对表达蛋白进行检验, 构建既能与人红细胞结合, 又能与 RV 抗体反应的双功能融合蛋白。目的是为了进一步建立狂犬病毒抗体快速检测红细胞凝集试验方法。

表 1 2E8scFv、Kg 基因引物序列

Tab. 1 Primers of 2E8scFv and Kg

基因名称 Gene	引物名称 Primer	引物序列 Sequences of primers(5'-3')	产物长度/bp Length/bp
2E8scFv	2E8scFV-U	cgc gga tcc cag gtg cag ttg aag gag tca	732bp
	2E8scFV-D	ggt gca tcc ttc atc tat ttc caa ctt tgt ccc cga	
Kg	Kg-U	aca aag ttg gaa ata gat gaa gga tgc acc aat ctg	999bp
	Kg-D	ccg gaa ttc tat aat gcc gtt gaa gaa cac	

注:引物均由北京博迈德公司合成

Note: Primers are synthesised by BIOMED CO., LTD, Beijing.

1.4 2E8Kg 融合基因原核表达载体的构建及鉴定 以 2E8scFV-U/2E8scFV-D 和 Kg-U / Kg-D 为引物, 从 pMD-2E8scFv 和 pMD-G 重组质粒中分别扩增融合基因 2E8Kg 的 5' 端片段 2E8scFv 和 3' 端片段 Kg 基因。PCR 扩增条件均为: 95 °C 预变性 5

1 材料与方法

1.1 重组质粒、载体、菌株和血清 重组质粒 pMD-G(含有狂犬病毒 G 基因主要抗原表位区)、鼠抗 RV 高免血清由军事医学科学院军事兽医研究所扈荣良研究员惠赠; 重组质粒 pMD-2E8scFv(含有抗人红细胞 H 抗原单链抗体基因)^[11]由军事医学科学院野战输血研究所章金刚研究员惠赠; 原核表达载体 pET-TrX、表达菌株 BL21(DE3)pLysS 均由本实验室保存; 7 份 RV 阳性血清、7 份 RV 阴性血清、犬细小病毒(CPV)阳性血清、犬瘟热病毒(CDV)阳性血清均由本实验室保存。

1.2 主要试剂 Kod-plus 高保真酶为 TOYOBO(日本)产品; T₄DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH I、EcoR I、及 Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa(日本)公司; IPTG 购自 Promega 公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒购自 TIANGEN 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 为 Beyotime 产品; Ni-NTA 蛋白纯化树脂为 QIAGEN 公司产品; 氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽均为 Sigma 公司产品; 其它化学试剂均为南宁(中国)生化药品仪器公司分析纯产品。

1.3 重组 PCR 引物设计 根据重叠延伸 PCR 的原理和狂犬病毒 G 基因与 2E8scFv 基因序列, 设计 4 条重组 PCR 引物(表 1)。其中引物 2E8scFv-U/2E8scFv-D 用于扩增合成 2E8scFv 基因, 引物 Kg-U/Kg-D 用于扩增合成 Kg 基因。2E8scFv 3' 末端 15 个碱基和 Kg 5' 端 15 个碱基为互补序列(阴影部分)用于基因的拼接, 拼接顺序为 2E8-Kg。2E8scFv-U 和 Kg-D 中的下划线部分为引入的 BamH I、EcoR I 酶切位点。

min; 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以纯化后的 2E8scFv 和 Kg 基因为模板, 采用(SOE)PCR 方法拼接成 2E8Kg 融合基因。第一轮 PCR 反应体系为: 2E8scFv 和 Kg 基因各 0.5 μL、10× Buffer2.5

μL 、 $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ KOD-plus 高保真酶 $0.5 \mu\text{L}$ 、 10 mmol/L dNTPs $2.5 \mu\text{L}$ 、用灭菌双蒸水加至总体积 $25 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 1 min , 60°C 退火 1 min , 72°C 延伸 2 min , 7 个循环。当第一步反应结束后, 在反应体系中加入引物 2E8scFv-U 和 Kg-D 各 $0.5 \mu\text{L}$, 然后 95°C 预变性 5 min ; 95°C 变性 1 min , 60°C 退火 1 min , 72°C 延伸 2 min , 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min 。将上述 PCR 产物纯化回收后与 pMD18-T Simple 载体连接, 转化 DH₅感受态细胞, 提取质粒, 经 PCR 及 BamH I、EcoR I 双酶切鉴定后送测序公司测序。测序正确后将融合基因 2E8kg 亚克隆到原核表达载体 pET-Trx 中, 构建了原核表达质粒 pET-Trx-2E8kg。

1.5 2E8Kg 融合基因的诱导表达及 SDS-PAGE 分析 将鉴定正确的 pET-Trx-2E8Kg 原核表达质粒转化入 BL21(DE3)pLysS 中进行诱导表达, 表达后经 SDS-PAGE 电泳验证其是否表达, 用 Band-Scan 软件测定目的蛋白相对含量。离心收集诱导表达菌液, 用细菌洗涤液初步洗涤后, 加入细裂解液作用 30 min 后用细胞破碎仪菌破碎处理 3 遍, 分别收集沉淀和上清, 沉淀用包涵体洗涤液洗涤两遍后, 用包涵体溶解液溶解, 将上述溶解液和上清样品进行 SDS-PAGE 电泳, 进行可溶性分析。

1.6 2E8Kg 融合蛋白的纯化与复性 将诱导菌液扩大培养, 按上述方法制备包涵体后, 采用亲和层析法和谷胱甘肽再氧化法对融合蛋白进行纯化和复性, 复性 24 h 后, 用透析液透析 48 h , 每 6 h 换液一次, 透析袋内的液体即为纯化和复性后的蛋白。用 PEG20000 浓缩复性蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定其浓度。

1.7 2E8kg 融合蛋白的 Western-blot 检测 将纯化后的 2E8kg 融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜(NC)上, 将膜用封闭液(5%的脱脂奶粉) 4°C 封闭过夜, 用 TBST 洗涤, 一抗加入鼠抗 RV 高免血清, 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG, 最后用二氨基联苯胺(DAB)底物显色液显色, 边摇动边观察, 至条带清晰后加入双蒸水终止其反应, 观察结果。

1.8 红细胞凝集试验检测 2E8kg 融合蛋白的双功能生物学活性 取 7 份 RV 阳性血清, 同时设 7 份 RV 阴性血清作对照, 取 96 孔血凝板, 每孔中加入 $50 \mu\text{L}$, 然后再向每个孔中依次加入 $10 \mu\text{L}$ 双功能融合蛋白(1.2 mg/mL)和 $20 \mu\text{L} 2\%$ O 型人红细胞, 混匀后静置 30 min 观察结果; 分别取 A、B、AB 型

人红细胞, 按同样的方法操作, 观察结果。

2 结 果

2.1 2E8Kg 融合基因原核表达载体的构建 以重组质粒 pMD-2E8scFv 和 pMD-G 为模板, 分别扩增出两条大小分别为 732 bp 和 999 bp 的目的片段, 命名为 2E8scFv 和 Kg(如图 1), 与预期扩增片段一致。以琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段 2E8scFv 和 Kg 为模板, 通过(SOE)PCR 拼接成 2E8Kg 融合基因, 将其克隆到 pMD18-T Simple 载体上, 鉴定正确后插入原核表达载体 pET-Trx, 通过 PCR(如图 2)及 BamH I、EcoR I 双酶切鉴定后测序, 测序结果表明该片段与融合基因 2E8Kg 一致, 大小为 1731 bp 且读码框正确。表明融合基因和原核表达载体构建成功。

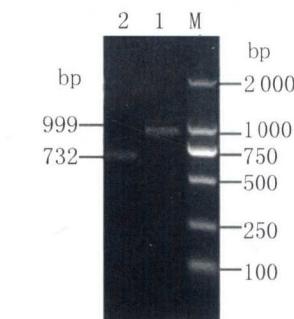


图 1 目的基因 2E8scFv 和 Kg 的 PCR 扩增图

M: DNA2000 标准分子量; 1: Kg 基因; 2: 2E8scFv 基因

Fig. 1 PCR amplification of 2E8scFv and Kg genes

M: DNA Marker 2000; 1: Kg gene; 2: 2E8scFv gene

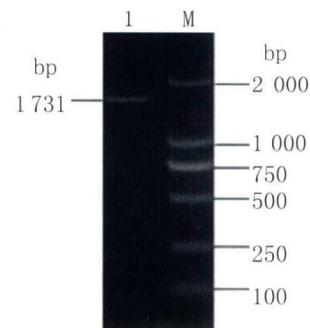


图 2 融合基因 2E8Kg 的 SOE-PCR 扩增图

M: DNA2000 标准分子量; 1: 2E8Kg 融合基因

Fig. 2 Amplification of 2E8Kg fusion gene by SOE-PCR

M: DNA Marker 2000; 1: 2E8Kg fusion gene

2.2 2E8Kg 融合蛋白的表达、可溶性分析、复性及纯化 取 pET-Trx-2E8Kg 阳性转化菌进行 IPTG 诱导表达, 同时设 pET-Trx 空载体转化菌为对照, 结果在 37°C , IPTG 浓度为 0.7 mmol/L , 诱导 3 h

时获得最大表达, 表达量占菌体蛋白总量 23.5% 左右。SDS-PAGE 分析表明, 表达产物主要以不溶的包涵体形式存在, 相对分子质量约 77.7 kD(如图 3), 与预期蛋白分子大小一致。利用亲和层析法对变性溶解的目的蛋白进行纯化并用 BandScan 生物学软件进行分析, 结果表明目的蛋白洗脱后的纯度提高到了 98.9%(图略)。BCA 蛋白定量试剂盒测定复性浓缩后蛋白含量约为 1.7 mg/mL。

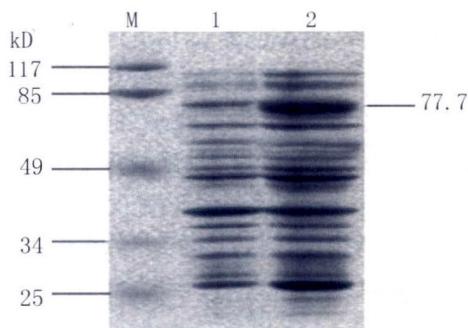


图 3 pET-Trx-2E8Kg 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳的结果

M: 低分子量蛋白 marker; 1: 空载体对照; 2: 诱导后重组菌蛋白

Fig. 3 Identification on expressed product of pET-Trx-2E8Kg recombinant bacteria by SDS-PAGE

M: Protein MW marker; 1: Negative control; 2: Recombinant bacteria protein after induction

2.3 2E8Kg 融合蛋白 Western-blot 检测 用 RV 高免血清对 2E8Kg 融合蛋白进行 Western-blot 检测, 结果发现约在 77.7 kDa 处出现一条特异性条带, 而同时用 CPV 和 CDV 阳性血清对 2E8Kg 融合蛋白进行 Western-blot 检测, 结果无任何免疫印迹条带出现(图 4), 说明 2E8Kg 融合蛋白能够与 RV 高免血清发生特异反应, 具有良好的免疫反应原性。

2.4 红细胞凝集试验检测 2E8Kg 融合蛋白的生物学活性 用纯化和复性后的 2E8Kg 融合蛋白、2% 人“O”型红细胞、7 份 RV 阴、阳性血清进行红细胞凝集试验, 结果 7 份 RV 阳性血清均可观察到强凝集现象(图 5), 而 7 份 RV 阴性血清未观察到凝集现象(图 6)。用血型定型试剂盒筛选出 A、B 和 AB 型人红细胞与 RV 阳性血清进行同样的试验, 结果也观察到强凝集现象(图 7)。用 CPV, CDV 阳性血清分别与 2E8Kg 融合蛋白作用, 结果未发生凝集(图 8)。上述结果说明 2E8Kg 融合蛋白不但能够与 RV 高免血清发生特异反应, 而且能与人红细胞结合(无血型限制), 具有双功能特性。

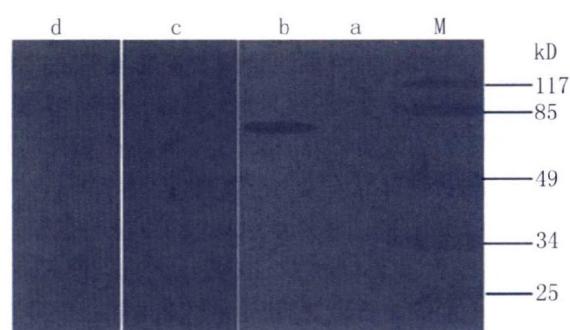


图 4 pET-Trx-2E8Kg 重组菌表达产物的 Western-blot 鉴定
M: 低分子量蛋白 marker; a: 空载体对照; b: 诱导后 pET-Trx-2E8Kg 重组菌蛋白; c: CPV 阳性血清阴性对照; d: CDV 阳性血清阴性对照。

Fig. 4 Identification on expressed product of pET-Trx-2E8Kg recombinant bacteria by Western-blot

M: Protein MW marker; a: Negative control; b: Recombinant bacteria pET-Trx-2E8Kg protein after induction; c: Negative control of CPV positive serum; d: Negative control of CDV positive serum

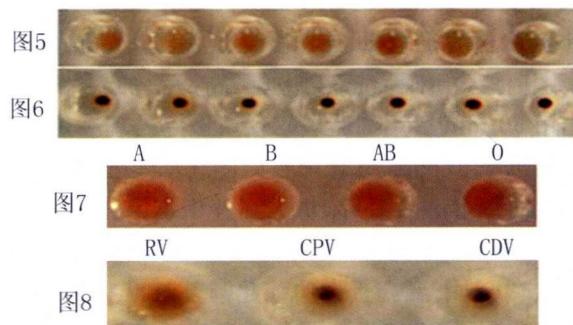


图 5 狂犬病毒阳性血清与 2E8Kg 双功能融合蛋白及人 O 型红细胞的红细胞凝集试验

图 6 狂犬病毒阴性血清与 2E8Kg 双功能融合蛋白及人 O 型红细胞的红细胞凝集试验

图 7 狂犬病毒阳性血清与 2E8Kg 双功能融合蛋白及人红细胞的红细胞凝集试验

图 8 犬不同病毒阳性血清与 2E8Kg 双功能融合蛋白及人 O 型红细胞的红细胞凝集试验

Fig. 5 Erythrocyte agglutination test of 2E8Kg fusion protein, RV positive serum, and O type human red blood cells;

Fig. 6 Erythrocyte agglutination test of 2E8Kg fusion protein, RV negative serum, and O type human red blood cells;

Fig. 7 Erythrocyte agglutination test of 2E8Kg fusion protein, RV positive serum, and human red blood cells;

Fig. 8 Erythrocyte agglutination test of 2E8Kg fusion protein, different virus-positive serum of dog, and O type human red blood cells.

3 讨 论

狂犬病是人畜共患的自然疫源性传染病, 目前尚无有效的治疗方法, 疫苗免疫预防狂犬病的发生

尤其重要^[12]。我国狂犬病发病死亡人数位居重点传染病死亡数和病死率榜首,易感动物发病呈逐年上升的趋势,要彻底根除狂犬病,首先就必须消灭动物的狂犬病,特别是隐性带毒动物及野生动物的狂犬病。针对狂犬病的现状,如何利用有效的诊断方法对隐性带毒动物快速诊断,对狂犬病疫苗免疫后的动物进行抗体监测及免疫效果评估,是保证人和动物安全的当务之急。

目前,狂犬病现有的诊断方法对仪器和专业人员的要求较高,检测成本昂贵,且耗时相对较长,因而极大的限制了它们在基层单位的使用。从而导致动物狂犬病免疫效果评估的工作开展较为困难,这对控制和消灭动物狂犬病十分不利。自体红细胞凝集试验以其快速、简便、不需要任何仪器,仅凭肉眼就可以观察结果的特点在人类疾病快速诊断中得到了较好的应用。由于犬红细胞表面抗原十分复杂,要寻找各类血型的共有抗原十分困难,为此,本研究借助表面抗原背景清楚的人红细胞作为指示剂建立检测动物病原抗体的红细胞凝集实验方法。

由于本实验拼接的融合基因长度较长,在初步PCR扩增和拼接的过程中,发生了基因突变,1 237位碱基由A突变为T,形成了一个终止密码子TGA,无法正确表达此融合蛋白。为此改用Kod-plus高保真酶对其进行扩增,扩增结果测序没有发生碱基的突变。构建原核表达体系一般需要综合考虑3大因素:表达载体、宿主菌株、表达诱导条件。本试验在融合蛋白表达的过程中尝试了多种可溶性原核表达载体,都没有得到相应的可溶性表达或表达量太低。在经过表达诱导条件的筛选、优化后,最后选取原核表达载体pET-Trx,在37℃,IPTG浓度为0.7 mmol/L,诱导3 h时获得较高的表达。由于表达产物以不溶的包涵体形式存在,该融合蛋白需要经过复杂的包涵体溶解、变性、复性过程,这极大的影响了融合蛋白的生物学活性,导致在目前建立的红细胞凝集试验过程中出现凝集的时间较长,与人血型检测的速度相比仍有一定的差距,估计与2E8kG双功能融合蛋白生物学活性不高有关。为此本试验拟从以下3个方面进行研究,一是筛选不同的宿主菌株;二是在2E8scFv与RV-Kg基因两个功能区之间引入一个连接肽,以克服因直接拼接,造成两个功能区相互遮掩而导致活性下降的可能。三是继续寻找新的可溶性表达系统及可溶性表达条件,达到获得双功能融合蛋白的可溶性表达,减少因包涵体变性、复性造成活性降低的目的。

参考文献:

- [1]Balsamo GA, Ratard R, Claudet A. The epidemiology of animal bite, scratch, and other potential rabies exposures. Louisiana [J]. J La State Med Soc, 2009, 161(5): 260-265.
- [2]Gaudin Y, Ruigrok RWH, Tuffereau C, et al. Rabies virus glycoprotein is a trimer[J]. Virology, 1992, 187 (2): 627-632. DOI: 10.1016/0042-6822(92)90465-2
- [3]Benmansour A, Leblois H, Coulom P, et al. Antigenicity of rabies virus glycoprotein[J]. J Virol, 1991, 65(8): 4198-4203.
- [4]Yin Z, Liu JH. Animal Virology[M]. 2nd edition. Beijing: Science Press, 1997:780-781. (in Chinese)
- 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社.1997:780-781.
- [5]Hu Y, Yang JY, Zhu L, et al. Expression, purification and characterization of an anti-human RBC scFv-HIV gpl60 fusion protein for hemagglutination-based rapid detection of antibodies to HIV in whole blood[J]. Chin J Exp Clin Virol, 2007, 21(1): 76-78. (in Chinese)
- 胡燕,杨健洋,朱雷,等.抗人红细胞抗体和HIV抗原融合蛋白的构建及活性鉴定[J].中华实验和临床病毒学杂志,2007,21(1): 76-78.
- [6]Gupta A, Chaudhary VK. Whole-blood agglutination assay for on-site detection of human immunodeficiency virus infection[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 2814-2817. DOI: 10.1128/JCM.41.7.2814-2821.2003
- [7]Siedenr M, Zapirz V, Ishida M, et al. Performance of rapid syphilis tests in venous and fingerstick whole blood specimens [J]. Sex Transm Dis, 2004, 31(9): 557-560. DOI: 10.1097/01.olq.0000137903.48413.5e
- [8]Li H, Pan JC, Liu Z, et al. Preparation and characterization of non-agglutinating mAbs against membrane antigen on human erythrocytes[J]. J Cell Mol Immunol, 2005, 21(4): 473-475. (in Chinese)
- 李卉,潘纪春,刘子,等.抗人红细胞膜抗原非凝集型单克隆抗体的研制及特性鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(4): 473-475.
- [9]Liao WJ, Qin SM, Wu JM, et al. Construction and biological activity detection of an anti-human red blood cell single chain fragment variable-pseudorabies virus gE bifunctional fusion protein [J]. J Agr Biotechnol, 2010, 18(3): 562-566. (in Chinese) DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.03.023
- 廖文军,覃绍敏,吴健敏,等.抗人红细胞单链抗体(scFv)-伪狂犬病毒(PRV)-gE蛋白双功能融合蛋白的构建及生物学活性检测[J].农业生物技术学报,2010,18(3): 562-566. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.03.023
- [10]Qin SM, Bai AB, Wu JM, et al. Preparation and bioactivity of anti-human red blood cell scFv and CSFV E2 bifunctional fusion protein[J]. Chin J Biotech, 2010, 26(1): 28-34. (in Chinese)
- 覃绍敏,白斌斌,吴健敏,等.抗人红细胞单链抗体与猪瘟E2蛋白双功能融合蛋白的构建及生物学活性检测[J].生物工程学报,2010,26(1): 28-34.
- [11]Shao CL, Shi LJ, Yao ZX, et al. Cloning and expression of the variable region genes of the monoclonal antibody against H antigen on human erythrocyte[J]. J Immunol, 2008, 24(2): 238-242. (in Chinese)
- 邵长利,史利军,姚站馨,等.抗人红细胞H抗原单链抗体基因克隆和表达[J].免疫学杂志,2008,24(2): 238-242.
- [12]Li ZS, Liu AL, Tan RR, et al. Research development of rabies [J]. China Anim Husbandry Vet Med, 2010, 37(7): 189-191. (in Chinese)
- 李泽盛,刘爱林,谭荣荣,等.狂犬病研究进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(7):189-191.

收稿日期:2011-11-02;修回日期:2012-02-22