



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160202

绿色荧光蛋白 GFP 多克隆抗体的制备及 在多种细胞中的特异性鉴定

董彬¹, 胡贺贺¹, 王晶¹, 孟德梅^{1,2}, 樊振川^{1,2}

(1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

2. 天津科技大学新农村发展研究院, 天津 300457)

摘要: 绿色荧光蛋白是当前在生物及生物医学研究当中应用最为广泛的一种荧光标记蛋白. 为开发一种高灵敏度、高特异性以及简单经济的 GFP 多克隆抗体, 并使之适用于在跨物种细胞里表达的 GFP 蛋白进行检测, 本文利用 *gfp* 基因 cDNA 全序列分别构建了带有 6×His 和 GST 标签的原核表达载体 pET28A-*gfp* 和 pGEX-2T-*gfp*, 并将其转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 细胞进行诱导表达, 而后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 表达鉴定, 分别获得了相对分子质量为 2.6×10^4 和 5.2×10^4 的重组 6×His/GST-GFP 融合蛋白. 将亲和纯化的 6×His-GFP 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 采集第 5 次免疫后血清用 ELISA 测定效价为 1 : 32 000. 抗血清依次经 Protein A 亲和纯化和 GST-GFP 抗原抗体纯化后, 用免疫印迹实验 (Western blot) 方法检测抗体特异性, 结果表明制备的多克隆抗体能很好地识别在莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、HEK293 细胞和大肠杆菌中表达的 GFP, 对继续开展 GFP 相关研究具有重要意义.

关键词: 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体; 免疫印迹

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2017)02-0007-06

Preparation of Polyclonal Antibody for Green Fluorescent Protein (GFP) and Characterization of its Specificity in Different Cells

DONG Bin¹, HU Hehe¹, WANG Jing¹, MENG Demei^{1,2}, FAN Zhenchuan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Institute for New Rural Development, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: GFP is one of the most popular fluorescent proteins used to detect and quantify targeted proteins in living organisms. To develop a high sensitive antibody for its detection or signal capture in different kind of organisms, 6×His-tagged and GST-tagged prokaryotic expression plasmids, pET28A-*gfp* and pGEX-2T-*gfp*, were constructed, by inserting *gfp* into the pGEX-2T and pET28A vectors respectively and then were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for protein expression. 12% SDS-PAGE analysis results showed that the molecular weights of the fusion protein 6×His-GFP and GST-GFP were 2.6×10^4 and 5.2×10^4 , respectively. The 6×His-GFP fusion protein was purified by affinity adsorption purification to immunize New Zealand white rabbits. The 5th immune serum was collected and the antibody titer was determined to be 1 : 32 000 by ELISA. The antiserum was purified by Protein A affinity adsorption purification and immobilized GST-GFP purification, and the specificity of polyclonal antibodies was evaluated by Western blot in three kind of organisms including chlamydomonas, HEK293 cells and bacteria. Results show that the polyclonal antibody prepared can specifically and precisely bind GFP in all kind of organisms, which can be used for more GFP and GFP related research.

Key words: prokaryotic expression; protein affinity purification; polyclonal antibody; Western blot

收稿日期: 2016-06-02; 修回日期: 2016-07-01

基金项目: 国际遗传工程与生物技术中心 (ICGEB) 研究项目 (CRP/CHN15-01)

作者简介: 董彬 (1989—), 男, 陕西渭南人, 博士研究生; 通信作者: 樊振川, 教授, fanzhen@tust.edu.cn

数字出版日期: 2016-12-01; 数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20161201.1104.006.html>

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 于 1974 年由 Morise 等^[1]在水母中发现并分离出来. 该蛋白包含 238 个氨基酸, 第 65~67 位残基 (Ser-Tyr-Gly) 自发形成荧光发色基团为对羟基本咪唑啉酮^[2]. 直到 1994 年, Chalfie^[3]首次将绿色荧光蛋白应用在活体当中, 在原核细胞大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和真核细胞秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中表达成功, 可以通过观察绿色荧光的方法对该蛋白在活体内进行定位. 随后通过对 GFP 的 DNA 序列进行分析, 并对其中一些氨基酸进行替换和突变, 证实突变可以导致产生红色荧光的蛋白 (red fluorescent protein, RFP)^[4] 和黄色荧光的蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP)^[5]. 突变蛋白如红色荧光蛋白和黄色荧光蛋白等已经被广泛应用于活体细胞定位、内源蛋白检测以及单分子成像^[6]等方面.

GFP 相对分子质量约为 2.6×10^4 , 易于与其他蛋白融合表达, 对受体细胞无毒副作用, 且对其检测方式多样, 如可以直接在荧光显微镜中观察其在活体中的定位和定量^[7], 亦可进行免疫印迹实验 (Western blot) 对其进行检测和定量. 然而, 利用 GFP 对相应内源蛋白进行活体定量时, 由于活体细胞本身的一些自荧光物质的存在, 会对实验结果产生较大影响^[8-9], 因而不能对荧光信号进行准确定量. 此外, 组织或细胞在各种理化处理过程中, GFP 易被猝灭, 不利于对组织中 GFP 标记蛋白进行细胞内定位及所在组织的结构和功能的原位分析^[10]. 因此, 如果有一种对 GFP 高灵敏度和高特异性的抗体存在, 就可以通过利用免疫印迹方法对 GFP 及其标记蛋白进行定量. 目前, 抗 GFP 蛋白抗体的研究已有很多, 存在的问题是大多数多克隆抗体或单克隆抗体仅能对一种或少数几种细胞内表达的 GFP 蛋白进行特异性识别, 而对于其他种属细胞内表达的 GFP 并不能进行很好的专一性识别, 主要原因是细胞背景干扰过高.

对于如今科学研究的需要, 如果一种抗体可以广泛地应用于检测多种种属细胞, 可以显著提高效率, 降低成本. 目前, 能针对多种种属细胞的 GFP 多克隆抗体还未见报道, 而多克隆抗体成本低廉, 生产快速的特点引人注目. 因此, 制备能针对多种种属细胞的 GFP 多克隆抗体势在必行, 本实验室采用简单和经济的原核表达方法制备了高特异性的 GFP 抗体, 并运用多种方法对抗体纯化以提高抗体特异性. 此外, 利用 Western blot 在多种属细胞中检测了抗体的特异性, 从而为 GFP 作为一种标记蛋白使用提供了一种更为经济有效的检测抗体.

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒及实验动物

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-blue、BL21 (DE3) 感受态细胞、HEK293 细胞、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) CC-125 野生藻株和质粒 pBSK-*gfp*、pGEX2T、pET28A 均为本实验室保存. 新西兰雄性大白兔 2 只, 1.5~2.0 kg, 由天津欧阳实验种兔场提供.

1.2 主要试剂

蛋白 Marker、限制性核酸内切酶、DNA 连接酶, 美国 Thermo 公司; DNA marker, 北京全式金生物技术有限公司; 蛋白纯化用填料 Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 和 Glutathione SepharoseTM 4B 以及抗体纯化介质 Protein A SepharoseTM CL-4B, 美国 GE Healthcare 公司; 免疫动物用弗式完全佐剂和不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; NC 膜, 美国 PALL 公司; HRP 标记的羊抗兔抗体, 美国 Jackson Immuno Research 公司; ECL 显色液, 美国 Millipore 公司; 脱脂奶粉, 美国 BD 公司; 曝光底片, 美国柯达公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.3 pGEX-2T-*gfp* 和 pET28-*gfp* 原核表达载体的构建

以 pBSK-*gfp* 质粒为模板, 用上游引物 5'-GCGGATCCATGGCCAAGGGCGAGGA-3' (加 *Bam*H I 酶切位点)、下游引物 5'-CTAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3' (加 *Hind* III 酶切位点) 进行 *gfp* 基因扩增, 反应条件为: 95 °C 1 min; 95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min. 取 2 μL PCR 产物进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析. 然后再用 *Bam*H I 和 *Hind* III 回收的目的基因、pGEX-2T 和 pET28A 载体进行双酶切, 然后将带有黏性末端的目 的基因和载体用 T4 DNA 连接酶连接后, 转化入 *E. coli* XL1-blue 感受态细胞, 挑取阳性菌落过夜培养, 提取质粒, 酶切和测序验证.

1.4 融合蛋白的表达与纯化

1.4.1 6×His-GFP 和 GST-GFP 融合蛋白的诱导表达及鉴定

将正确的重组质粒 pET28-*gfp* 和 pGEX2T-*gfp* 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 分别挑取单菌落于含有 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中和含有 120 μg/mL 氨苄青霉素 LB 液体培养基中过夜培养, 再以 1:20 的比例放大培养至吸光度为 0.6~0.8 时,

加入 0.2 mmol/L IPTG 于 23 °C 诱导 6 h 使蛋白大量表达,同时设置对照组即不加 IPTG 诱导组.离心收集菌体并超声裂解获得全蛋白,全蛋白经 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后,收集上清液和沉淀.取全蛋白、上清液和沉淀分别与 2×蛋白上样缓冲液混合后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测.

1.4.2 6×His-GFP 融合蛋白的纯化

将诱导表达后的菌体进行超声波破碎后,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后,加入到预先平衡好的 Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化柱中,室温结合 1 h 后使样品流经纯化柱,用洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗去杂蛋白,再用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, pH 7.4)洗脱并收集目的蛋白,使用核酸微量测定仪对其进行蛋白浓度测定.将洗脱出的目的蛋白进行 12% 的 SDS-PAGE 分析^[11].

1.4.3 GST-GFP 融合蛋白的纯化

将诱导表达后的菌体进行超声波破碎后,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后加入到预先平衡好的 Glutathione Sepharose™ 4B 纯化柱中,室温结合 1 h 后使样品流经纯化柱,用洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, pH 7.4)洗去杂蛋白,再用洗脱缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH 7.4)洗脱并收集目的蛋白.将目的蛋白进一步通过分子筛(Superdex™-200 pg)进行分离纯化,流量 1 mL/min,将洗脱出的目的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析.

1.5 多克隆抗体的制备及效价的测定

1.5.1 多克隆抗体的制备

取 2 mg 纯化后的 6×His-GFP 融合蛋白与 2 mL 弗氏佐剂混合后乳化完全,免疫新西兰大白兔,采用颈背部多点注射法,初次免疫使用弗氏完全佐剂且免疫前耳动脉采血作为阴性对照血清.之后每 10 d 进行加强免疫,使用弗氏不完全佐剂,一共加强免疫 4 次,最后 1 次加强免疫后耳动脉采血,利用间接 ELISA 法测定抗血清的效价,效价合格后,股动脉采血,4 °C 静置过夜后收集血清,分装冻存.

1.5.2 多克隆抗体效价的测定

本实验采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价,以 GST-GFP 融合蛋白作为包被抗原,用 5% 的脱脂乳粉封闭后,以所得的抗血清为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体为二抗,然后经过 3, 3',

5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,利用酶标仪测定 A₄₅₀ 处的吸光度,并计算出抗血清的效价.以实验组血清 A₄₅₀ 与阴性对照血清 A₄₅₀ 的比值大于等于 2.0 为阳性,其最高稀释度即为抗血清的效价^[12-13].

1.6 多克隆抗体的纯化及特异性分析

1.6.1 多克隆抗体的纯化

分离完的抗血清首先使用 Protein A Sepharose™ CL-4B 亲和纯化专一性吸附 IgG,去除 IgG 之外的其他抗体分子,纯化条件为:结合缓冲液(12 mmol/L Na₂HPO₄, 8 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0),洗脱缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸, pH 2.7),流量 0.5 mL/min.收集吸收峰对应的洗脱液,用 1 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)将洗脱液 pH 调至中性.然后将 Protein A Sepharose™ 纯化完的抗体采用 GST-GFP 免疫亲和纯化法进一步纯化:将 GST-GFP 融合蛋白固定在硝酸纤维素膜亲和纯化法进一步纯化^[14],随后经 Western blot 检测多克隆抗体的特异性.

1.6.2 抗体特异性检测

免疫印迹:取 20 μg 处理后的含有 GFP 表达的莱茵衣藻裂解上清液^[15]、HEK293 细胞裂解上清液^[16]和 *E. coli* 细胞裂解上清液^[17]加入 1.5 μL 5×上样缓冲液混匀,进行 SDS-PAGE 和电转印后,蛋白转移到 NC 膜上,5% 的脱脂奶粉封闭;多克隆抗体稀释度 1:1 000,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1:5 000,然后曝光压片显影(ECL 法)^[18].

2 结果与分析

2.1 pET28A-gfp 和 pGEX-2T-gfp 原核表达载体的构建

PCR 扩增获得 723 bp 的片段,与 GFP 预期大小一致.将构建的 pGEX-2T-gfp 和 pET28A-gfp 重组表达载体进行 BamHI 和 HindIII 双酶切验证,均获得条带大小为 723 bp 的目的片段,并经测序验证序列完全正确,说明表达载体构建成功(图 1).

2.2 融合蛋白的表达与纯化

2.2.1 6×His-GFP 和 GST-GFP 融合蛋白的诱导表达
在 IPTG 的诱导下,含有 pET28A-gfp 和 pGEX-2T-gfp 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株会大量表达目的蛋白,菌体经超声破碎后获得全蛋白,所得全蛋白经低温高速离心分离上清液和沉淀,然后经电泳、染色、脱色后分别在约 2.6×10⁴和 5.2×10⁴处可以看到目的蛋白大量表达,且蛋白的表达主要在上清液

中,其表达结果如图2所示.

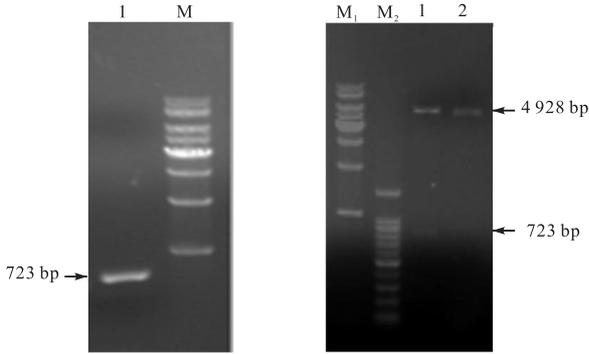


图1 *gfp* 的PCR扩增和重组表达质粒的双酶切验证
 Fig.1 PCR amplification of *gfp* and restriction identification of recombinant expression plasmids
 (a) 1. *gfp* 基因片段的PCR产物验证;M: 1 kbp marker.
 (b) M₁: 1 kbp marker;M₂: 100 bp marker;1. *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 pGEX-2T-*gfp*;2. *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 pET28A-*gfp*.

图1 *gfp* 的PCR扩增和重组表达质粒的双酶切验证
 Fig.1 PCR amplification of *gfp* and restriction identification of recombinant expression plasmids

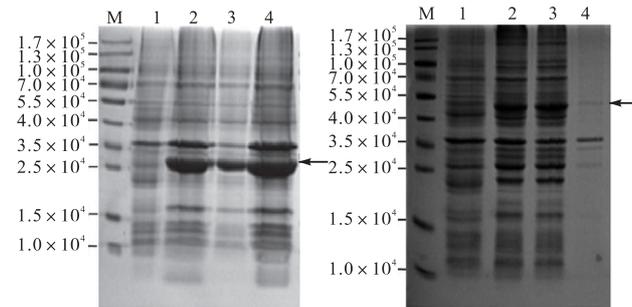


图2 SDS-PAGE检测重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达
 Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3)
 (a) M. 蛋白 marker;1. 诱导前裂解液全蛋白;2. 诱导后裂解液全蛋白;3. 诱导后裂解液沉淀;4. 诱导后裂解液上清液.
 (b) 1. 诱导前裂解液全蛋白;2. 诱导后裂解液全蛋白;3. 诱导后裂解液上清液;4. 诱导后裂解液沉淀.

图2 SDS-PAGE检测重组蛋白在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达
 Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3)

2.2.2 6×His-GFP 和 GST-GFP 融合蛋白的纯化

6×His-GFP 融合蛋白的表达主要为可溶性表达,因此将诱导表达后的菌体经超声破碎以及高速离心后取上清液,于含有 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 填料的重力柱中进行亲和纯化,由于融合蛋白所含有的 6×His 标签能够特异性与上述填料结合,因此经过洗涤、洗脱等步骤即得到目的蛋白(图3(a)),可作为免疫动物所用抗原.同时,GST-GFP 融合蛋白经亲和纯化后,还有两条杂带(图3(b)),经分子筛(Superdex™-200 pg)进行分离纯化如图4(a)所示,可以得到较纯的目的蛋白如图4(b)所示,可作为后续抗体纯化用抗原.

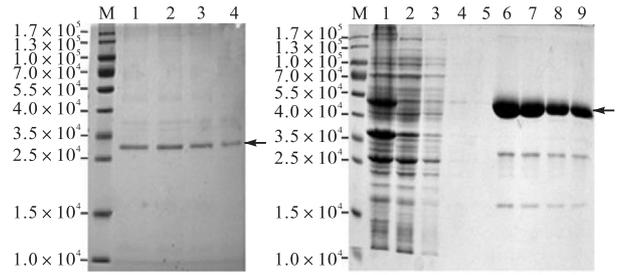
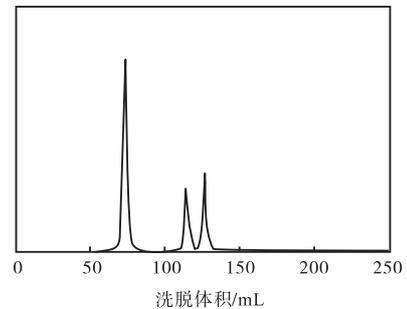
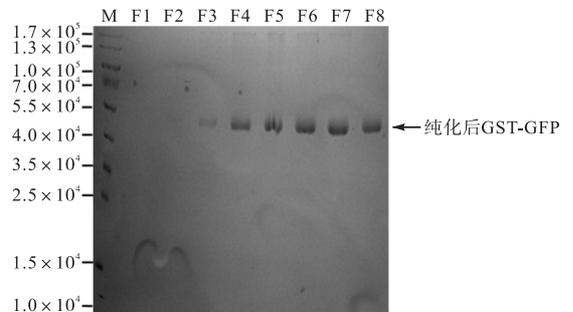


图3 SDS-PAGE检测亲和纯化后重组蛋白
 Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein by affinity adsorption purification.
 (a) M. 蛋白 marker;1—4. 洗脱组分.
 (b) M. 蛋白 marker;1. 诱导后 GST-GFP 全蛋白;2. 诱导后上清液;3. 诱导后沉淀;4—5. 漂洗组分;6—9. 洗脱组分.

图3 SDS-PAGE检测亲和纯化后重组蛋白
 Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein by affinity adsorption purification.



(a) GST-GFP 蛋白凝胶分离纯化峰图



(b) 凝胶柱分离纯化后目的蛋白

(a)第1个峰表示 GST-GFP;第2和第3个峰表示其他杂蛋白.
 (b)M. 蛋白 marker;F1—F8. 第1个峰的1—8号洗脱组分.

图4 GST-GFP 蛋白经 Superdex™-200 pg 分离纯化, SDS-PAGE 检测纯化后重组蛋白
 Fig.4 GST-GFP protein purified by Superdex™-200 pg and SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein

2.3 多克隆抗体的制备

2.3.1 抗血清效价的检测

用纯化得到的 6×His-GFP 融合蛋白免疫新西兰大白兔,经耳缘静脉少量采血,室温静置 2 h 或 4 ℃ 过夜后获得析出血清,以间接 ELISA 法测定抗血清的效价,利用酶标仪测定 A₄₅₀ 处的吸光度后计算出抗

血清的效价,结果如图5所示.由图5可知,1号兔抗血清的效价大于16 000,2号兔抗血清效价大于32 000,满足实验要求.

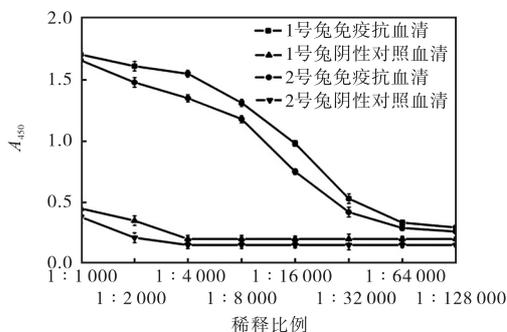
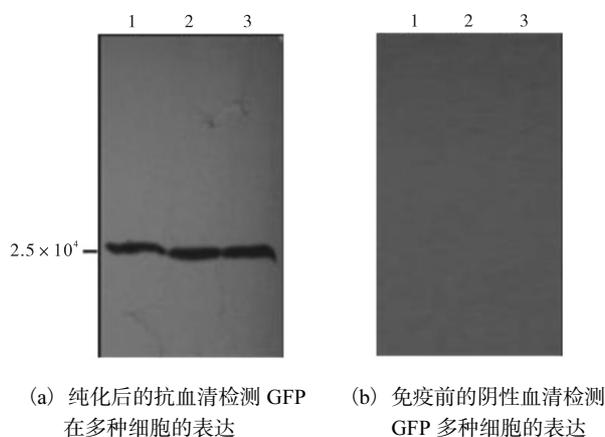


图5 间接ELISA法测定抗血清的效价

Fig. 5 Results of ELISA test of anti-GFP polyclonal antiserum

2.3.2 抗血清灵敏度和特异性检测

最终纯化的多克隆抗体能够正确地与莱茵衣藻、HEK293细胞和大肠杆菌中表达的 2.6×10^4 大小的GFP蛋白特异结合,证明所制备的多克隆抗体具有很好的特异性,可专一性识别不同种属细胞中表达的GFP蛋白(图6).



1. 莱茵衣藻;2. HEK293细胞;3. 大肠杆菌

图6 Western blot验证抗体特异性

Fig. 6 The antibody specificity detected by Western blot

3 讨论

GFP现在已经广泛应用在各个物种中作为标记蛋白进行细胞定位以及蛋白分析,因而开发适用于多种属细胞的GFP抗体是非常有必要的.由于单克隆抗体的生产成本高、生产周期较长,所以开发具有成本优势的GFP多克隆抗体就显得尤为迫切.本研究使用具有表达时间短、表达量高、蛋白较易纯化等优

势^[19]的大肠杆菌作为抗原制备的宿主.选择 $6 \times \text{His}$ (组氨酸)标签^[20-21]纯化免疫原蛋白,由于其标签相对分子质量小,对免疫动物产生的免疫反应也比其他如GST、MBP标签小,产生的抗体特异性和灵敏性也会更高,有研究使用GST-GFP融合表达后使用凝血酶对融合蛋白进行酶切得到的^[10]GFP蛋白作为免疫原,相比这种方法,本研究所采用的小相对分子质量标签亲和纯化后直接免疫动物具有更高效和经济的优势.对于抗血清的纯化,先采用亲和纯化,得到相应的IgG,随后采用抗原抗体纯化,使用高纯度的GST-GFP融合蛋白作为抗原与亲和纯化后的抗血清进行2次亲和纯化,这种方法能有效地提高抗体的特异性和灵敏度,使最终得到的抗体具有非常高的特异性,而且可以对不同种属来源的GFP蛋白进行特异性结合.由于GFP广泛应用在原核和真核细胞中,本研究利用本实验室具有的莱茵衣藻、HEK293细胞以及大肠杆菌这3种来源的表达GFP的宿主对抗体特异性进行测试,结果表明该多克隆抗体特异结合人源、植物源和细菌中来源的表达GFP蛋白.综上所述,本研究成功制备了GFP多克隆抗体,并通过免疫印迹实验证实其具有很好的特异性,为GFP的相关研究提供了实验基础.

参考文献:

- [1] Morise H, Shimomura O, Johnson F H, et al. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*[J]. *Biochemistry*, 1974, 13 (12): 2656-2662.
- [2] Cody C W, Prasher D C, Westler W M, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein[J]. *Biochemistry*, 1993, 32 (5): 1212-1218.
- [3] Chalfie M. Green fluorescent protein as a marker for gene-expression[J]. *Science*, 1994, 263 (5148): 151.
- [4] Ormo M, Cubitt A B, Kallio K, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Science*, 1996, 273 (5280): 1392-1395.
- [5] Espinet C, Gómez-Arbonés X, Egea J, et al. Combined use of the green and yellow fluorescent proteins and fluorescence-activated cell sorting to select populations of transiently transfected PC12 cells[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 100 (1/2): 63-69.
- [6] Schots A, Jm V D W. Green fluorescent protein fluobody immunosensors. Immunofluorescence with GFP-antibody fusion proteins[J]. *Methods in Molecular Biology*,

- 2002, 183(183): 265–273.
- [7] 王晓敏, 闫明霞, 梁琳慧, 等. GFP 和 Luc 双标技术在小鼠肿瘤模型建立中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(1): 2–7.
- [8] 朱吉, 李文林, 金彩霞, 等. 绿色荧光蛋白多克隆抗体的制备[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(1): 76–78.
- [9] 周盛梅, 孟凡国, 黄大年, 等. 绿色荧光蛋白及其应用[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 56–59.
- [10] 郑玥婷. 绿色荧光蛋白的原核表达、纯化以及抗体制备[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(1): 40–43.
- [11] Yan L, Wang J, Jing Y, et al. Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression & Purification, 2014, 95(5): 182–187.
- [12] Jiang W, Liu X, Wu D, et al. A simple, rapid one-step ELISA using antibody-antibody complex[J]. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2015, 62(1): 126–131.
- [13] Limsuwanchote S, Wungsintaweekul J, Yusakul G, et al. Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R1, a distinctive saponin from *Panax notoginseng*, and its application to indirect competitive ELISA[J]. Planta Medica, 2014, 80(4): 337–342.
- [14] Dietmar R, Markus H, Selman M H J, et al. High-throughput work flow for IgG Fc-glycosylation analysis of biotechnological samples[J]. Analytical Biochemistry, 2012, 432(2): 82–89.
- [15] Fan Z C, Behal R H, Geimer S, et al. *Chlamydomonas* IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly[J]. Molecular Biology of the Cell, 2010, 21(15): 2696–2706.
- [16] Fan Z C, Dennis J C, Bird R C. Bovine viral diarrhoea virus is a suitable viral vector for stable expression of heterologous gene when inserted in between N(pro) and C genes[J]. Virus Research, 2008, 138(1/2): 97–104.
- [17] 何火聪, 刘树滔, 潘剑茹, 等. GST-TAT-GFP 融合蛋白的表达、纯化及鉴定[J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(4): 334–337.
- [18] Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, et al. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF-beta1[J]. Febs Letters, 2003, 545(2/3): 115–119.
- [19] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 411–421.
- [20] Pryor K D, Leiting B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His 6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system[J]. Protein Expression & Purification, 1997, 10(3): 309–319.
- [21] Kelman Z, Yao N, O'Donnell M. *Escherichia coli* expression vectors containing a protein kinase recognition motif, His 6-tag and hemagglutinin epitope[J]. Gene, 1995, 166(1): 177–178.

责任编辑: 郎婧

(上接第6页)

- [28] Bah C S, Aeld B, Mcconnell M A, et al. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 98–107.
- [29] Ko J Y, Lee J H, Samarakoon K, et al. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 52(2): 113–120.
- [30] Mikkelsen M L, Francesco P, Roberto B, et al. Stabilized subtilisin composition: United States, 3941353[P]. 2015–07–21.
- [31] Horne G R, James A P, Baker D R. Process for stabilizing particles alkali metal percarbonate: United States, 4009113[P]. 1997–09–09.
- [32] Verma A, Pal H S, Singh R, et al. Potential of alkaline protease isolated from *Thermoactinomyces* sp. RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process[J]. Plasma Science & Technology, 2011, 72(6): S35.
- [33] Souza F R D, Gutterres M. Application of enzymes in leather processing: A comparison between chemical and coenzymatic processes[J]. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2012, 29(3): 473–482.
- [34] Senthilvelan T, Kanagaraj J, Mandal A B. Application of enzymes for dehairing of skins: Cleaner leather processing[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2012, 14(5): 889–897.

责任编辑: 郎婧