

猪囊尾蚴 CE18 重组蛋白的复性纯化及抗原性鉴定

张少华, 贾万忠, 骆学农, 景志忠, 吴国华, 郑亚东, 郭爱疆, 才学鹏

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046

摘要: 猪囊尾蚴 CE18 重组蛋白(rCE18)在大肠杆菌表达后形成包涵体, 为了获得高纯度的、有生物活性的 rCE18, 本研究采用超声破碎菌体, 0.2%、2% DOC(脱氧胆酸钠)逐次洗涤包涵体及 0.9% SKL(十二烷基肌氨酸钠)溶解包涵体后, 利用透析与凝胶过滤层析技术相结合对 rCE18 进行复性和纯化。同时, 采用 GST-FF 亲和柱层析及 SDS-PAGE 胶回收蛋白两种方法纯化 rCE18, 比较三者的纯化效果。并通过间接 ELISA 检测复性蛋白的生物学活性。结果表明: 经透析与凝胶层析复性纯化后的 rCE18 蛋白的纯度可达到 60%以上, 活性回收率为 41.3%, 间接 ELISA 证实, 复性后的 rCE18 蛋白能特异性识别猪囊虫阳性血清, 检测敏感性高达 97.2%, 与全囊虫抗原检测的符合率为 100%。本试验初步建立了猪囊尾蚴 rCE18 包涵体纯化及复性的有效方法, 为猪囊尾蚴 rCE18 蛋白的诊断应用奠定了基础。

关键词: 猪囊尾蚴, CE18 重组蛋白, 复性, 纯化, 透析, 凝胶过滤层析

Renaturation, Purification and Antigenicity Identification of Recombinant Protein of *Cysticercus cellulosae* Expressed in *Escherichia coli*

Shaohua Zhang, Wanzhong Jia, Xuenong Luo, Zhizhong Jing, Guohua Wu, Yadong Zheng, Aijiang Guo, and Xuepeng Cai

Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: To obtain the recombinant 18 kD protein with high purity and normal bioactivity of *Cysticercus cellulosae* (rCE18), *E. coli* cells with the rCE18 were disrupted ultra-sonically, and the inclusion bodies were washed with a solution containing 0.2% deoxycholic acid sodium (DOC) and 2% DOC, respectively. Then they were denatured with 0.9% sodium lauroyl sarcosine (SKL) followed by dialysis and gel filtration to refold and purify the target protein. At the same time, this method was compared with GST-FF affinity chromatography and recovering from SDS-PAGE gel. Biological activity of purified rCE18 was analyzed with indirect ELISA, and the purity of the products was identified using SDS-PAGE. The purity of refolded inclusion bodies exceeded 60% and the total recovery of activated protein rCE18 was about 41.3%. The specificity of rCE18 reached up to 97.2% using indirect ELISA. An effective way for purifying and refolding rCE18 expressed in *E. coli* as inclusion bodies was established. rCE18 with higher purity and activity was obtained, which has the potential for developing diagnosis methods of porcine cysticercosis.

Keywords: *Cysticercus cellulosae*, rCE18, renaturation, purification, dialysis, gel filtration chromatography

Received: July 26, 2007; **Accepted:** March 13, 2008

Supported by: the Gansu Provincial Fund for High-tech Small and Medium-sized Enterprises (No. 2GS055-A43-057).

Corresponding author: Xuepeng Cai. Tel: +86-931-8342535; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

甘肃省科技型中小企业技术创新基金 (No. 2GS055-A43-057) 资助。

近年来在寄生虫研究领域,重组蛋白作为疫苗和诊断抗原,因其特异性好,可以大量制备等优点而占据非常重要的地位。原核表达系统已能高水平表达多种寄生虫蛋白,但多以包涵体(Inclusion body, IB)的形式存在^[1],需要将表达的包涵体蛋白在体外重折叠转化为具有天然构象的生物学活性蛋白。猪囊尾蚴 CE18 是与猪囊尾蚴病特异诊断相关的抗原分子,而且本实验室已成功构建、筛选出了高表达量的猪囊尾蚴 18 kD 重组菌株,但其表达蛋白也以包涵体形式存在^[2]。本试验针对包涵体蛋白复性回收率低、容易凝集的难点,探索了猪囊尾蚴 CE18 包涵体蛋白的体外优化复性及纯化方法,以期为今后猪囊尾蚴病诊断抗原的工艺化生产提供有效途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

表达宿主菌 BL21(DE3)为 Novagen 公司产品。pGEX-4T-1-CE18 表达质粒由本实验室构建并保存。

1.1.2 试剂

DOC(脱氧胆酸钠), SKL(十二烷基肌氨酸钠), DTT(二巯苏糖醇), IPTG, Tryptone, Yeast Extract, 蛋白 marker, 氧化型/还原型谷胱甘肽(GSSG/GSH)及兔抗猪 IgG-HRP 购自上海生物工程有限公司。GST-FF 填料购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司。其他常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器

VCX 500 型超声波破碎仪(USA), 蛋白检测仪(Eppendorf), ÄKTA Prime Purifier 层析系统(Amersham), Ultra15(30 kD)超滤管(Millipore), GeBAflex-tube 透析管(Israel), 高速低温离心机(Beckman), 凝胶成像仪(Millipore), 垂直板电泳系统(DYY-III 型, 北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 重组菌的诱导表达

将复苏的重组菌接种至 $2 \times \text{YT}$ 培养液(含 $100 \mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素)中, 37°C 、 230 r/min 进行增菌培养;至 A_{600} 达 $0.6 \sim 1.0$ 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 37°C 诱导表达 5 h ;收集菌体,用 0.01 mol/L PBS($\text{pH } 7.2$)悬浮洗涤沉淀 3 次。留样品进行 SDS-PAGE 分析,检测目的蛋白的表达形式。

1.2.2 包涵体前期处理条件的确定

(1) 超声波破碎时间: 用 25 mL Solution A(50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 5% 甘油, 0.2 mmol/L DTT, $\text{pH } 7.9$)重悬菌体, -70°C 反复冻融 3 次,加入 $200 \mu\text{L}$ 10 mg/mL 溶菌酶、 $8 \mu\text{L}$ 100 mmol/L PMSF 及 $25 \mu\text{L}$ TritonX-100, 于 30°C 温育 15 min 后,在冰浴中超声破碎菌体(功率 200 W , 工作 8 s , 间歇 6 s),分别取超声波破碎 5 、 15 及 20 min 的菌液沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,确定包涵体的释放程度。

(2) 包涵体的洗涤: 将收集的沉淀用 Solution A 充分重悬,加入 20% DOC 贮存液,使 DOC 终浓度为 0.2% ,混匀,室温静置至少 20 min , 4°C 、 $13\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min 收集包涵体沉淀,如此重复洗涤 3 次。再以含终浓度 2% DOC 的 Solution A 逐次洗涤包涵体蛋白,留样品进行 SDS-PAGE 分析,检测 0.2% 及 2% DOC 逐次洗涤纯化包涵体的效果。

(3) 包涵体的变性溶解: 在洗涤后的包涵体中加入 Solution A 及 20% SKL 贮存液(SKI 净浓度为 0.9%),剧烈搅动使沉淀慢慢溶解,室温静置约 1.5 h 。将溶解的蛋白质悬液于 4°C 、 $13\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min ,收集上清。用紫外分光光度计测定蛋白含量,校正公式如下:

蛋白含量(mg/mL)= $(1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}) \times \text{稀释倍数}$ ^[3]

并对 SKL 溶解后的上清及沉淀进行 SDS-PAGE 分析,确定 SKL 变性溶解的效果。

(4) 透析复性时间的选择: 以含 0.2 mmol/L DTT, 0.3 mmol/L GSSG 和 3 mmol/L GSH 的 Solution A 作为复性液,将溶解的包涵体用 $3/4$ 体积的复性液稀释后,装入截留分子量为 8 kD 的透析袋中;在 4°C 条件下,用 10 倍体积的复性液进行透析,每 8 h 换液 1 次,同时充分搅拌。于复性 0 h 、 12 h 、 24 h 、 48 h 、 72 h 取样,分析蛋白的复性程度^[4]。

1.2.3 纯化方法的选择

(1) GST-FF 亲和柱纯化包涵体蛋白: 将 1.2.2 (1)中超声破碎后离心收集的上清用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤,取适量平衡好的 GST-FF 填料转至过滤上清中,置摇床缓慢结合 $1.0 \sim 1.5 \text{ h}$, 4°C 、 500 r/min 离心 5 min ,弃上清;将结合蛋白的 GST-FF 填料转至柱中,用缓冲液 1(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, $\text{pH } 8.3$)

至少洗 10 个床体积, 流速 1 mL/min; 再加入缓冲液 2(50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L GSH, pH 8.3)洗脱并收集目的蛋白, 测定蛋白浓度, 留样进行 SDS-PAGE 分析蛋白的纯化效果。

(2) 凝胶过滤层析: 取透析好的 rCE18 蛋白经 Sephacryl S-300 柱层析复性纯化, 全部层析试验在 ÄKTA Prime Purifier 层析工作台完成。每次上样 0.5 mL, 分部收集洗脱样品, 经 Ultra15(截留分子量 30 kD)超滤管浓缩后, 进行蛋白含量测定, 用 SDS-PAGE 分析其纯度及回收率。

(3) SDS-PAGE 胶回收包涵体蛋白: 将变性处理的 rCE18 蛋白进行常规 SDS-PAGE; 电泳后采用考马斯亮兰 R250-KCl 染色脱色法^[5]处理胶片至背景清晰, 用干净刀片准确切下目的蛋白条带, 放入电洗脱平衡液平衡 2 次; 之后将胶片装入 GeBAflex-tube 中, 装满电洗脱液, 恒压 100 V 电泳 2.5~3.0 h, 反向接通电源 120 s, 使膜上的蛋白回到电洗脱液中, 反复吹打管中液体, 并将之转移至另一干净离心管中, 4°C、8000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 加入 5 倍体积的冷丙酮, 混匀后置 -20°C 沉淀约 24 h, 再于 4°C、12 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀, 真空干燥后, 用蛋白稀释液复溶沉淀, 测定蛋白浓度, 并进行 SDS-PAGE 分析回收蛋白的纯度及回收率。

1.2.4 复性重组蛋白间接 ELISA 的活性鉴定

将纯化的 rCE18 以每孔 0.5 µg/100 µL 包被 96 孔酶标板, 同时设全囊虫抗原及 GST 抗原对照; 经间接 ELISA 分别检测已知的猪囊虫阴、阳性血清 47 头份; 经 OPD-H₂O₂ 底物显色后, 置酶标检测仪读取 A₄₉₀ 值。结果判断以阳性血清样品的相对 A₄₉₂ 值 ≥ 阴性参考血清相对 A₄₉₂ 值的 2 倍时判为阳性, 否则判为阴性。数据应用 SPSS 软件进行统计分析, 组间差异显著性检验用方差分析及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 重组蛋白表达形式

对诱导的重组菌超声波破碎沉淀和上清进行 SDS-PAGE 电泳分析, 发现诱导的重组菌得到了高效表达; 目的蛋白主要存在于菌体沉淀中, 即以包涵体形式表达; 重组蛋白的分子量约 33 kD(图 1), 与文献[2]报道的一致。

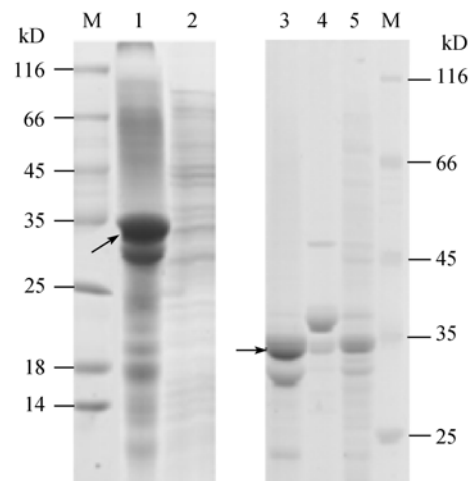


图 1 诱导后表达产物及变性包涵体蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of rCE18 after purified and eluted through Sephacryl S-300

M: protein marker; 1: precipitate after ultrasonication; 2: supernatant after ultrasonication; 3: supernatant of inclusion bodies dissolved by SKL; 4: precipitate of inclusion bodies dissolved by SKL; 5: precipitate after ultrasonication; the arrows indicate the target protein

2.2 超声波处理菌体最佳时间的筛选

对超声波处理 5、15、20 min 后的沉淀物进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明: 超声波处理 5 min 时包涵体蛋白的释放量与 20 min 的释放量接近, 但超声波处理 5 min 的菌液比较粘稠, 含有多量染色体 DNA, 影响包涵体的沉淀; 而超声波处理 15 min 的菌液比较清亮, 因此确定超声波破碎菌体的最佳时间为 15 min。

2.3 包涵体最佳洗涤次数的筛选

样品经 0.2% 及 2% 的 DOC 逐次洗涤的 SDS-PAGE 分析表明: 增加洗涤次数, 并不能有效去除约 30 kD 及 38 kD 的主要杂蛋白, 但可将 45 kD 以上的杂蛋白洗去(图 2)。因此, 确定用 0.2% 及 2% 的 DOC 各洗涤包涵体 1 次, 这样既可节省纯化过程的时间又可减少操作的繁琐性。

2.4 SKL 溶解包涵体的效果

SKL 溶解包涵体的 SDS-PAGE 结果表明: 0.9% SKL 可以完全溶解包涵体, 目的蛋白得率高, 不溶性蛋白去除量大, 明显减少了后续纯化过程的难度(图 1); 另外每 500 mL 诱导菌液可获得溶解包涵体蛋白约 47.18 mg。

2.5 透析复性时间的确定

分别于复性 0、12、24、48、72 h 取包涵体透析样品, 经 4°C、13 000 r/min 离心 10 min 后, 通过

凝聚物生成量, 判断蛋白复性程度。结果表明: 在透析的整个过程中, 包涵体样品未出现可见的浑浊现象; 在透析的第 24~48 h, 蛋白离心后未见明显的凝聚物, 提示包涵体得到较大程度的复性。

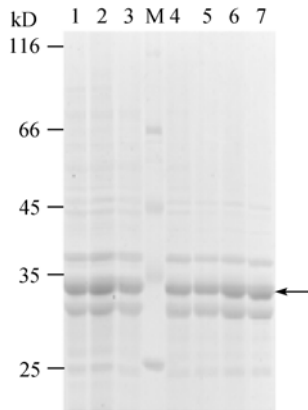


图 2 超声破碎及洗涤纯化包涵体的 SDS-PAGE
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of inclusion bodies after ultrasonication and washing

M: protein marker; 1~3: precipitate after ultrasonication within 5, 15 and 20 min, respectively; 4~7: inclusion bodies washed by 0.2% and 2% DOC, respectively

2.6 凝胶复性的选择

rCE18 蛋白经 Sephacryl S-300 凝胶层析纯化后, 发现分离效果较好, 洗脱曲线出现 2 个主峰(图 3B); SDS-PAGE 结果显示(图 3A), Ia 和 Ib 峰洗脱液中均含有目的蛋白 rCE18, 但未能去除约 30 kD 的杂蛋白; 用薄层扫描分析, 发现目的蛋白含量约占总蛋白的 60% 以上, 浓缩回收率可达 41.3%(表 1)。Sephacryl S-300 柱层析后的蛋白浓缩样品进行含量测定, 发现浓度<5 mg/mL 时, 蛋白不会发生凝集。

2.7 GST-FF 亲和柱纯化包涵体蛋白

基于 rCE18 蛋白带有 GST 标签, 利用 GST-FF 亲和柱纯化诱导表达后裂解上清中的 rCE18 蛋白, 结果未获得目的蛋白; SDS-PAGE 显示在约 26 kD 处呈现 1 条带, 推测为 GST 蛋白(图 4)。提示利用

GST-FF 亲和柱不能有效纯化 rCE18 蛋白。

2.8 SDS-PAGE 胶回收包涵体蛋白的效果

应用 GeBAflex-tube 回收 rCE18 包涵体蛋白, 取得了较为理想的效果。SDS-PAGE 结果显示(图 5), 回收的目的蛋白为单一条带, 有效去除了约 30 kD 的杂蛋白带。蛋白的纯度和回收率分别达到 90% 及 70% 以上(表 1)。

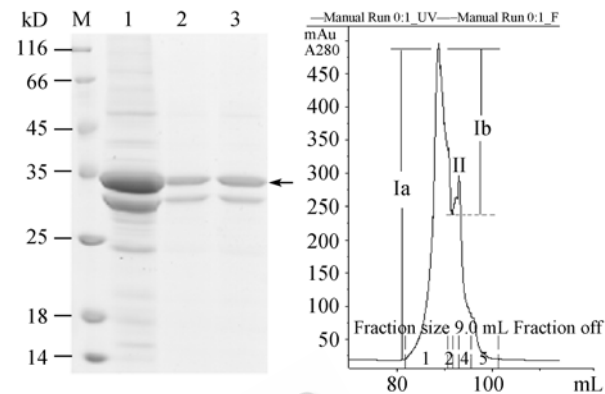


图 3 Sephacryl S-300 纯化包涵体的 SDS-PAGE 分析(A) 及蛋白洗脱图(B)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis(A) of purified rCE18 and pattern (B) of eluate through Sephacryl S-300

M: protein markers; 1: inclusion bodies dissolved by 0.9% SKL; 2: refolding samples in Ia fraction; 3: refolding samples in Ib fraction

表 1 猪囊尾蚴 CE18 包涵体蛋白凝胶纯化复性及胶回收得率

Table 1 Yield and purity of recombinant 18kD protein of *Cysticercus cellulosae* renatured by Sephacryl S-300 gel chromatography and recovered by SDS-PAGE

Groups	Volume (mL)	Total proteins (mg)	Expressed proteins (mg)	Purity (%)	Recovery rate (%)
Induced lysis cell	500	1426.3050	220.9200	—	—
Denatured CE18	15	—	47.1820	>60	—
Renatured CE18	45	47.1820	19.4549	>60	41.3
Recovered CE18	1	1.27	0.909	>90	>70

表 2 rCE18 和全囊虫粗制抗原 ELISA 检测结果的比较

Table 2 Comparison of ELISA results between rCE18 and crude whole-cyst antigens

Coating antigens	Standard negative sera		Standard positive sera		S/N	Positive rate (%)
	Samples	A ₄₉₀	Samples	A ₄₉₀		
Crude antigens	11	0.2138 ± 0.0461	36	0.5989 ± 0.2235	2.8012	97.2
GST	11	0.2155 ± 0.0555	36	0.3253 ± 0.0949	1.5095	0
CE18-1	11	0.4693 ± 0.1725	36	0.5907 ± 0.2292	1.2587	—
CE18-2	11	0.2780 ± 0.0574	36	0.5908 ± 0.1644	2.1252	97.2
CE18-3	11	0.0931 ± 0.0165	36	0.2059 ± 0.0748	2.2116	97.2

Note: CE18-1, denatured with SKL; CE18-2, refolded by gel filtration; CE18-3, recovered by SDS-PAGE

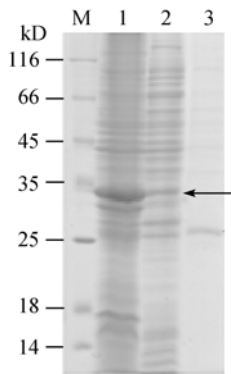


图4 亲和柱纯化 rCE18 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified rCE18 proteins by affinity chromatography

M: protein marker; 1: precipitate after ultrasonication; 2: supernatant after ultrasonication; 3: rCE18 purified by GST-FF affinity chromatography

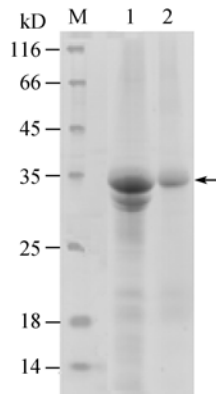


图5 rCE18 胶回收 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of rCE18 proteins recovered from SDS-PAGE gel

M: protein marker; 1: rCE18 inclusion bodies dissolved by 0.9% SKL; 2: rCE18 purified by SDS-PAGE

2.9 复性重组蛋白的 ELISA 活性鉴定

间接 ELISA 检测结果表明(表 2): 在相同反应条件下, 全囊虫抗原、纯化复性的 rCE18 及胶回收的 rCE18 抗原均与猪囊虫阳性血清有良好的反应活性, 能特异性识别猪囊虫阳性血清, 检测的 P/N 值均大于 2.0; 其中复性 rCE18 检测的敏感性达 97.2%, 与全囊虫抗原检测的符合率为 100%, 且与全囊虫抗原的反应原性差异不显著($P>0.05$)。另外, 胶回收 rCE18 抗原的纯度虽然较高, 但与阴性血清反应的背景值过低, 以其作为诊断抗原易出现假阳性; 而变性 rCE18 与阴性血清反应的背景值较高, 即非特异性反应过高, 也不能直接作为诊断抗原。以上结果说明, rCE18 抗原经透析与 Sephacryl S-300 凝胶层析处理后, 达到了有效复性及纯化的目的。所获 rCE18 抗原具有与全囊虫抗原相近的诊断特异性及敏感性, 可用于囊虫病的诊断。

3 讨论

从包涵体中纯化表达蛋白的一个优点是包涵体易和细胞的其他成分分离, 且可以避免蛋白酶对外源蛋白的降解作用^[7]。包涵体中除含有 50% 以上的重组蛋白外, 还含有一些细菌成分, 如一些外膜蛋白、质粒 DNA 和其他杂质。在纯化过程中, 包涵体的纯度会直接影响到后续变性、复性及纯化的效果, 因此, 包涵体的前期优化处理非常关键。其中, 去除细菌碎片便是纯化包涵体的一个重要步骤。本实验采用超声波破碎细菌的方法, 确定最佳超声波破碎菌体时间为 15 min, 不仅使菌体完全破碎, 最大量地释放包涵体, 而且可在很大程度上切断 DNA 降低黏度, 使包涵体的沉淀变得容易; 同时, 还使细菌碎片变得尽量小, 利于后续的洗涤纯化。在包涵体的洗涤过程中, 采用了 0.2% DOC 及 2% DOC 分别洗涤包涵体的方法。这是因为低浓度的 DOC 不会造成包涵体溶解, 但能溶解脂质和脂膜蛋白^[8], 在一定程度上去除菌体杂蛋白, 提高包涵体的纯度。

溶解包涵体的常用变性剂主要有盐酸胍、尿素、SDS 等。有些变性剂存在以下缺点: 如 SDS 带负电荷, 可与蛋白质结合形成共价复合物, 不利于纯化; 高离子强度的盐酸胍和尿素溶液可使蛋白质重折叠期间产生聚合而影响复性效果。而 SKL 是一种比较理想的温和性阴离子去垢剂^[9,10], 其优点是: 在高浓度时有变性作用, 低浓度时对蛋白有稳定的作用。某些包涵体蛋白在 0.3% SKL 浓度下就可以很好的溶解, 但本试验中使用 0.9% SKL, 可使 rCE18 包涵体的变性效果更为完全。

包涵体蛋白的体外复性是一个非常复杂的过程。将层析技术应用于包涵体的复性是一个有效的方法^[11,12]。凝胶的分离范围在一定程度上会影响蛋白复性过程中变性态、聚集态以及天然态和变性剂之间的分离度^[13]。Gu 等^[14]在复性碳酸脱水酶时发现, Superdex200 复性的活性回收率高于 Superdex 75。Fahey 等^[15]发现, 变性尿激酶纤溶酶原激活物 u-PA 经 Sephacryl S-300 复性较 Sephacryl S-400 所得到的活性回收率高, 可达到 65%。这是因为对一个特定的蛋白, 凝胶对蛋白质聚集态和天然态的分离度和渗透效果不同, 分离度大则蛋白聚集的可能性相对要小。目前, 许多研究者采用尿素作为变性剂溶解包涵体蛋白, 柱上复性使用脉梯度方法^[16], 但是这

种方法的应用范围有限, 因为许多变性蛋白在酸性溶液中的溶解度很差。另外, 由于猪囊尾蚴 rCE18 蛋白含有二硫键, 在复性液中添加 0.2 mmol/L DTT、0.3 mmol/L GSSG 和 3 mmol/L GSH, 有助于二硫键的正确形成^[17], 提高活性回收率。

本试验采用超声波破碎菌体 15 min, 低浓度 DOC 逐次洗涤包涵体及 0.9% SKL 溶解包涵体的方法, 对 rCE18 蛋白复性前期的纯化处理起到了很好的效果, 大大提高了后续纯化步骤的效率。结合透析和凝胶过滤层析两种复性方法, 使 rCE18 蛋白达到了较好的纯度及活性回收率, 作为诊断抗原效果良好。本试验为猪囊尾蚴 rCE18 蛋白复性技术提供了新的可行途径, 蛋白的活性回收率达到 41.3 %, 可满足实验室小量制备蛋白和诊断试剂的研发要求。

REFERENCES

- [1] Yan H, Chen XG. Refolding and purification of inclusion body and application in parasite research. *J Trop Med*, 2002, **2**(2): 184–186.
言慧, 陈晓光. 包涵体的纯化、复性及其在寄生虫研究中的应用. 热带医学杂志, 2002, **2**(2): 184–186.
- [2] Wu GH, Jing ZZ, Wang PY, *et al*. Development of ELISA for detection of antibodies to *Cysticercus cellulosae* using recombinant *E. coli*-expressed 18 kD proteins as antigen. Proceedings of Eighth Conference of Chinese Society of Veterinary Parasitology, 2004.
吴国华, 景志忠, 王佩雅, 等. 猪囊尾蚴 18ku 蛋白基因的克隆、表达及其重组蛋白间接 ELISA 诊断方法的建立. 中国畜牧兽医学学会家畜寄生虫学分会第五次代表大会暨第八次学术研讨会论文集, 2004.
- [3] Lu SD. Modern Molecular Biology Laboratory Techniques. 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999, 488.
卢圣栋. 现代分子生物学实验技术, 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 488.
- [4] Zeng LY, Huang Q, Chen LH, *et al*. The study of in vitro refolding conditions for humanized anti-CTLA4-scFv expressed in *E. coli*. *J Biomed Eng*, 2005, **22**(3): 588–592.
曾令宇, 黄强, 陈利弘, 等. 表达于大肠杆菌中的人源性抗 CTLA4 单抗抗体复性方法探索. 生物医学工程学杂志, 2005, **22**(3): 588–592.
- [5] Kang B, Tong Z. A fast staining-destaining method for SDS-PAGE which favours the recovery of protein. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2000, **27**(2): 210–211.
康彬, 童哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27**(2): 210–211.
- [6] Ding XZ, Zou XQ, Sun YJ, *et al*. Characterization of the insecticidal crystal protoxins from bacillus thuringiensis strain 4.0718. *J Agri Biotechnol*, 2005, **13**(3): 365–371.
丁学知, 邹先琼, 孙运军等. 苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株晶体毒素性质的研究. 农业生物技术学报, 2005, **13**(3): 365–371.
- [7] Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1986, **240**(1): 1–12.
- [8] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR, *et al*. Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Translated by Zhu HC, *et al*. Beijing: Science Press, 2002: 172–177.
马歇克 DR, 门泳 JT, 布格斯 RR, 等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 172–177.
- [9] Crivelli E, Cardamone M, Puri NK. A single step method for the solubilization and refolding of recombinant protein from *E. coli* inclusion bodies. *Aust J Biotechnol*, 1991, **5**(2): 78–80.
- [10] Suttner J, Dyr JE, Hamsikova E, *et al*. Procedure for refolding and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies using a strong anion exchanger. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, **656**(1): 123–126.
- [11] Müller C, Rinas U. Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *Escherichia coli* using size-exclusion chromatography. *J Chromatogr A*, 1999, **855**(1): 203–213.
- [12] Yoshii H, Furuta T, Yonehara T, *et al*. Refolding of denatured/reduced lysozyme at high concentration with diafiltration. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**(6): 1159–1165.
- [13] Wang CZ, Geng XD. Recent developments of protein refolding by size exclusion chromatography. *China Biotechnol*, 2004, **24**(7): 45–49.
王超展, 耿信笃. 蛋白质的排阻色谱复性的新进展. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(7): 45–49.
- [14] Gu ZY, Zhu XN, Ni SW, *et al*. Inhibition of aggregation by media selection, sample loading and elution in size exclusion chromatographic refolding of denatured bovine carbonic anhydrase B. *J Biochem Biophys Methods*, 2003, **56**: 165–175.
- [15] Fahey EM, Chaudhuri JB, Binding P. Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, **737**(1/2): 225–235.
- [16] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, **9**(5): 497–501.
- [17] Fang M, Huang HL. Advances in *in vitro* refolding of inclusion body proteins. *Chin J Biotech*, 2001, **17**(6): 608–612.
方敏, 黄华梁. 包涵体蛋白体外复性的研究进展. 生物工程学报, 2001, **17**(6): 608–612.