

• 动物及兽医生物技术 •

## 融合蛋白 TAT-RIG-I-GFP 的原核表达及其跨膜递送

盛晓丹<sup>1</sup>, 黄迪海<sup>1</sup>, 郭卉<sup>1</sup>, 刘霞<sup>1</sup>, 秦卓明<sup>1,2</sup>

1 山东省健牧生物药业有限公司, 山东 济南 250100

2 山东省农业科学院家禽研究所, 山东 济南 250100

盛晓丹, 黄迪海, 郭卉, 等. 融合蛋白 TAT-RIG-I-GFP 的原核表达及其跨膜递送. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1463–1468.

Sheng XD, Huang DH, Guo H, et al. Prokaryotic expression and transmembrane transfer of fusion protein TAT-RIG-I-GFP. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1463–1468.

**摘要:** 本研究旨在探讨融合蛋白 TAT-RIG-I-GFP 原核表达载体的构建并验证 TAT 在跨膜递送中的作用。首先设计了 4 对特异性引物, 克隆了绿头鸭 *Anas platyrhynchos* *RIG-I* 基因, 构建了 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 原核表达载体; 转化至感受态 DE3 细胞, 经 IPTG 诱导表达, 利用 His60 镍亲和层析柱纯化, 进行 SDS-PAGE; 然后, 将纯化后的上述两种表达蛋白分别孵育 DF-1 细胞; 最后利用荧光显微镜观察是否在 DF-1 细胞产生相应的荧光。结果证实, 携带有 TAT 的 pET-TAT-RIG-I-GFP 融合蛋白在 DF-1 细胞中显示出明显的绿色荧光; 而不具有 TAT 的 pET-RIG-I-GFP 蛋白却不能显示绿色荧光。这表明携带 TAT 的融合蛋白已成功进入 DF-1 细胞, 并在跨膜递送过程中发挥了关键作用。上述为进一步研制家禽的抗病毒药物奠定了基础。

**关键词:** 反式激活蛋白 (TAT), RIG-I, 融合蛋白, 跨膜递送

## Prokaryotic expression and transmembrane transfer of fusion protein TAT-RIG-I-GFP

Xiaodan Sheng<sup>1</sup>, Dihai Huang<sup>1</sup>, Hui Guo<sup>1</sup>, Xia Liu<sup>1</sup>, and Zhuoming Qin<sup>1,2</sup>

1 Shandong Jianmu Biological Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250100, Shandong, China

2 Institute of Poultry Science, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, Shandong, China

**Abstract:** We studied the construction of fusion protein TAT-RIG-I-GFP prokaryotic expression vector and verified the function of TAT in transmembrane delivery. First, four pairs of specific primers were designed, and the *RIG-I* gene of Mallard Duck (*Anas platyrhynchos*) was cloned. Then, the pET-TAT-RIG-I-GFP and pET-RIG-I-GFP prokaryotic expression vectors were constructed. Meanwhile, they were converted to *E. coli* BL21 (DE3), which were induced to be expressed after culture. After the purification of His-60 nickel affinity chromatography column and the identification of SDS-PAGE, the purified TAT-RIG-I-GFP and RIG-I-GFP proteins were incubated to DF-1 cells. Finally, fluorescence microscopy was used to observe whether the corresponding fluorescence was produced in DF-1 cells. The results showed that pET-TAT-RIG-I-GFP fusion with TAT showed obvious green fluorescence in

**Received:** March 24, 2019; **Accepted:** June 3, 2019

**Supported by:** Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2014CP023).

**Corresponding author:** Zhuoming Qin. Tel: +86-531-88972914; E-mail: qinzm1997@163.com.

山东省自然科学基金 (No. ZR2014CP023) 资助。

网络出版时间: 2019-06-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190620.1625.002.html>

DF-1 cells. However, the pET-RIG-I-GFP without TAT cannot display green fluorescence. This shows that TAT-fused protein have successfully delivered DF-1 cells and play a key role in transmembrane delivery. In conclusion, these results provide a solid material basis for further study of antiviral drugs in poultry.

**Keywords:** TAT, RIG-I, fusion protein, transmembrane delivery

视黄酸诱导基因蛋白 I (Retinoic acid induced gene I, *RIG-I*) 作为 RLRs 家族的一员, 是细胞内重要的病原识别受体, 由两个串联的 N-端半胱天冬酶募集结构域 (CARD)、DEXD/H 解旋酶结构域和 C 端调节结构域 (CTD) 构成<sup>[1]</sup>。*RIG-I* 在天然免疫反应中起关键作用, 通过识别细胞质中的病毒 ssRNA 和 dsRNA, 激活下游 I 型 IFN 的抗病毒反应。

近年来, 诸多学者在鸭、鹅等水禽体内克隆到 *RIG-I* 基因和蛋白, 并发现其介导 IFN- I 型天然免疫反应, 如激活 IRF-3、IFN- $\alpha/\gamma$ 、Mx1、PKR 等的表达, 在抵抗禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV)、新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV)、鸭坦布苏病毒 (Tembusu virus, TMV) 等病原感染和清除病毒方面发挥着重要作用<sup>[2-3]</sup>。由于鸡体内缺失 *RIG-I* 受体, 而鸭源、鹅源 *RIG-I* 基因均可在 DF-1 细胞中稳定表达, 并可识别 H5N1 等病毒核酸<sup>[4]</sup>, 因此, *RIG-I* 基因在鸡源细胞中的信号通路研究成为家禽抗病育种和抗病毒药物筛选的焦点。

反式激活蛋白 (Transactivator, TAT) 是蛋白质转导结构域 (PTD) 超家族的成员, 其与人免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) RNA 5'端 LTR 结合后能够提高 HIV 基因的转录水平。TAT 核心结构域 (YGRKKRRQRRR) 能够携带蛋白质、多肽、DNA 等外源性大分子穿透生物膜和生物屏障进入不同的细胞<sup>[5]</sup>。研究表明, TAT 核心结构域不仅能够促进大肠杆菌中的异源蛋白质表达, 还能提高异源蛋白质的产量和溶解度<sup>[6]</sup>。本研究构建 *RIG-I*、GFP 与 TAT 重组蛋白, 探讨其在 DF-1 细胞的跨膜递送功能, 为家禽抗病毒药物的研制

提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、质粒和实验动物

DF-1 细胞、DH5 $\alpha$  由山东省农业科学院家禽研究所惠赠, pCD513B 由本实验室保存, 健康绿头鸭 *Anas platyrhynchos* 购自济南黄台农贸市场。

### 1.2 试剂

Tks Gflex DNA Polymerase、In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit、限制性内切酶 *Xho* I、*Nhe* I、pET28a (+) 载体、DL5000 DNA marker、His60 Ni Gravity Columns (镍亲和层析柱)、DMEM 培养基、胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; Lipofectamine<sup>™</sup>2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; 质粒小量提取试剂盒购自天根公司; PCR 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

### 1.3 引物设计

根据绿头鸭 *Anas platyrhynchos* *RIG-I* 基因 (GenBank 登录号: EU363349) 设计含有 TAT 核心结构域序列的 *RIG-I* 特异性引物 P1、P2(下划线部分为 TAT 序列); 按照 In-Fusion<sup>®</sup>HD Cloning Kit 说明书要求, 分别设计 TAT-RIG-I 和 GFP 的原核表达引物 P3、P4 和 P5、P6。同时, 根据序列特点设计两端带接头的 *RIG-I*-GFP 原核表达引物 P7 和 P8 (表 1)。

### 1.4 重组质粒 pET-TAT-RIG-I 的构建

提取健康绿头鸭的脾脏组织, 按 Chen 等<sup>[2]</sup>方法制备其 cDNA, 并以其为模板, 使用特异性引物 P1、P2 扩增 TAT-RIG-I 片段。扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 63  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 30 个循环。将扩增出的 PCR 产物, 经琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收, 同时将其转化

表 1 本研究所用 PCR 引物

Table 1 Primers used in this study

Primer	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1	CACATATGT <u>ACGGCCGCAAGAAACGCCGCCAGCGCCGCCGC</u> ATGACGGCGG	2 832
P2	GCCTCGAGCTAAAATGGTGGGTACAAGTTGG	
P3	CGCGGCAGCCATATTACGGCCGCAAGAAACG	2 892
P4	TTCTCCTTTGCCCATAAATGGTGGGTACAAGTTGGAC	
P5	TTGTACCCACCATTATGGGCAAAGGAGAAGAAGCTT	774
P6	GTGGTGGTGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCATGCC	
P7	GTGGCGGCCGCTCGAGATGACGGCGGACGAGAAGCG	3 513
P8	GCCCTCTAGACTCGAGTTATTGTATAGTTCATCCATGCCA	

Note: the underlined part of the primer sequence is the Transactivator (TAT).

至 pET28a, 挑选阳性克隆, 获得重组质粒 pET-TAT-RIG-I。

## 1.5 融合蛋白表达载体 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 的构建

### 1.5.1 pET-TAT-RIG-I-GFP 的构建

以 pET-TAT-RIG-I 重组质粒为模板, 利用 P3、P4 为引物扩增 TAT-RIG-I 片段; 以 pCD513B 为模板, 利用 P5、P6 为引物扩增 GFP。将扩增出的产物片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定后回收, 按照 In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit 说明书要求与含有 *Xho* I、*Nhe* I 双酶切的 pET-28a(+)载体连接, 构建 pET-TAT-RIG-I-GFP。连接产物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆, 进行增菌培养, 提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定并测序。

### 1.5.2 pET-RIG-I-GFP 的构建

以 pET-TAT-RIG-I-GFP 为模板, P7、P8 为引物扩增 RIG-I-GFP, 构建 pET-RIG-I-GFP, 方法同上。重组质粒转化、PCR 鉴定和测序同 1.5.1。

## 1.6 重组载体的蛋白表达、纯化和 SDS-PAGE

将 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 转化感受态细胞 DE3 (大肠杆菌 BL21), 接种于含卡那霉素的 LB 平板上 37 °C 培养过夜, 划取单菌落至 5 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振摇过夜; 次日按 1:100 的体积比接种至 20 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振摇 1 h 后添加 IPTG

使其浓度为 0.5 mmol/L, 诱导 16 h 后, 离心收集菌体, PBS 漂洗 2 次, 超声波裂解菌体 (超声破碎 3 s, 间隔 4 s, 超声 30 次, 功率为 200 W), 4 °C、10 000 r/min 离心 25 min, 收集上清, 采用 His60 镍亲和层析柱分别对 TAT-RIG-I-GFP 和 RIG-I-GFP 的融合蛋白进行纯化和 SDS-PAGE 分析。同时, 设未诱导的和未纯化的菌体上清 (同上处理) 作为对照。

## 1.7 融合蛋白的跨膜递送

将纯化后的 TAT-RIG-I-GFP 和 RIG-I-GFP 蛋白脱盐处理, 加入适量无血清 DMEM 稀释。培养 DF-1 细胞至铺满单层, 弃上清, 清洗后分别加入 1 mL TAT-RIG-I-GFP、RIG-I-GFP 和无血清 DMEM 孵育 1 h, 用 PBS 清洗 3 遍后置于荧光显微镜下观察荧光信号。

# 2 结果与分析

## 2.1 重组质粒 pET-TAT-RIG-I 的构建

以绿头鸭的 cDNA 为模板, 扩增含 TAT 序列的 *RIG-I* 基因并转化至 pET28a, 构建原核表达载体 pET-TAT-RIG-I。经 PCR 鉴定和测序结果显示, 扩增出的 TAT-RIG-I 片段, 全长为 2 832 bp, 其中的 *RIG-I* 基因片段与绿头鸭 *RIG-I* 基因 (GenBank 登录号: EU363349) 同源性为 100% (图 1)。

## 2.2 带有荧光标记的重组质粒表达载体构建

按照 1.5.1 和 1.5.2 方法分别构建带有荧光标记的 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 融合蛋白表达载体, 转化至 DH5 $\alpha$  进行扩增, 提取其质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定和测序, 扩增出的目的基因片段长度分别为 3 546 bp 和 3 513 bp, 结果符合预期。这表明 TAT-RIG-I-GFP 和 RIG-I-GFP 均已成功克隆至 pET28a (+) 载体 (图 2)。

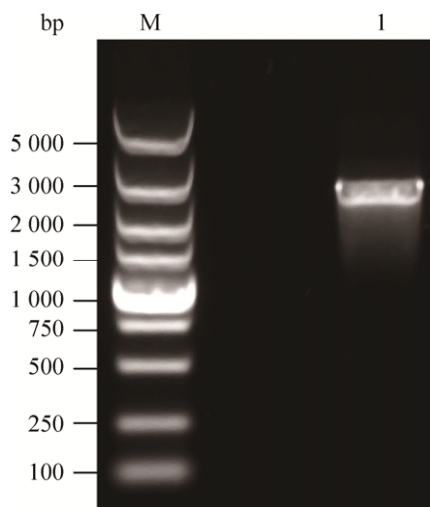


图 1 重组质粒 TAT-RIG-I 基因的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of TAT-RIG-I gene. M: DNA marker DL2000; 1: PCR identification of TAT-RIG-I gene.

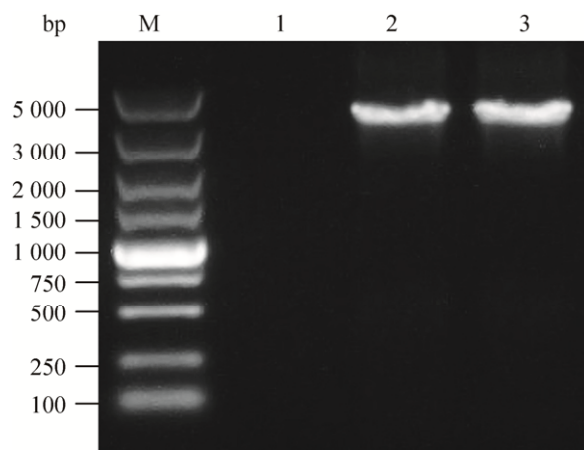


图 2 重组质粒 TAT-RIG-I-GFP 和 RIG-I-GFP 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identifications of TAT-RIG-I-GFP and RIG-I-GFP. M: DNA marker DL5000; 1: control group of pET28a; 2: PCR identification of pET-RIG-I-GFP; 3: PCR identification of pET-TAT-RIG-I-GFP.

## 2.3 重组载体的蛋白表达、纯化和 SDS-PAGE

将 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 两种重组载体同时转化 DE3 感受态细胞, 增菌培养, 分别进行 IPTG 诱导和非诱导的蛋白表达。结果发现, 该两种重组载体在 IPTG 诱导后, 其蛋白表达量明显增高, 且与 IPTG 未诱导组相比, 在 116.0–200.0 kDa 之间明显多出一个蛋白条带, 且经过 His60 镍亲和层析柱纯化后更加明显, 相对分子量约在 130 kDa, 二者的大小差异不大 (图 3)。

## 2.4 携带 TAT 融合蛋白的跨膜递送

利用纯化和脱盐处理的 TAT-RIG-I-GFP 和 RIG-I-GFP 两种融合蛋白孵育 DF-1 细胞 1 h 后清洗, 置于荧光显微镜下观察。结果发现: TAT-RIG-I-GFP 孵育的 DF-1 细胞内出现显著的绿色荧光信号 (200 $\times$ ), 而 RIG-I-GFP、DMEM 和 DF-1 细胞的空白对照组, 其细胞内均无绿色荧光。这表明携带 TAT 的融合蛋白可跨膜递送进入 DF-1 细胞, 而未携带 TAT 的融合蛋白则不能进入细胞 (图 4)。

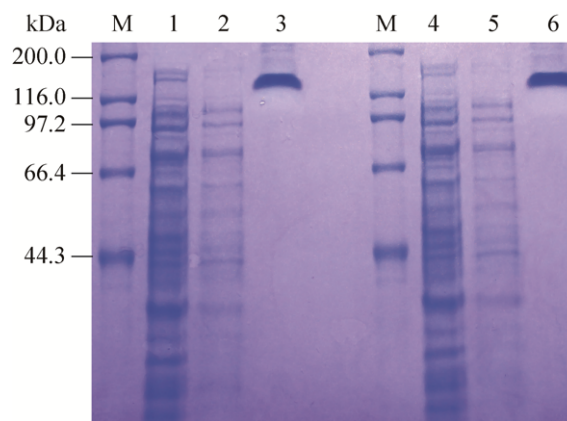


图 3 pET-TAT-RIG-I-GFP 和 pET-RIG-I-GFP 的 SDS-PAGE 分析和比较

Fig. 3 Analysis and comparison of pET-TAT-RIG-I-GFP and pET-RIG-I-GFP of SDS-PAGE. M: protein marker 200 kDa; 1: the expressed unpurified protein of pET-TAT-RIG-I-GFP; 2: the uninduced expressed protein of pET-TAT-RIG-I-GFP; 3: the expressed purified protein of TAT-RIG-I-GFP; 4: the expressed unpurified protein of pET-RIG-I-GFP; 5: the uninduced expressed protein of pET-RIG-I-GFP; 6: the expressed purified protein of RIG-I-GFP.

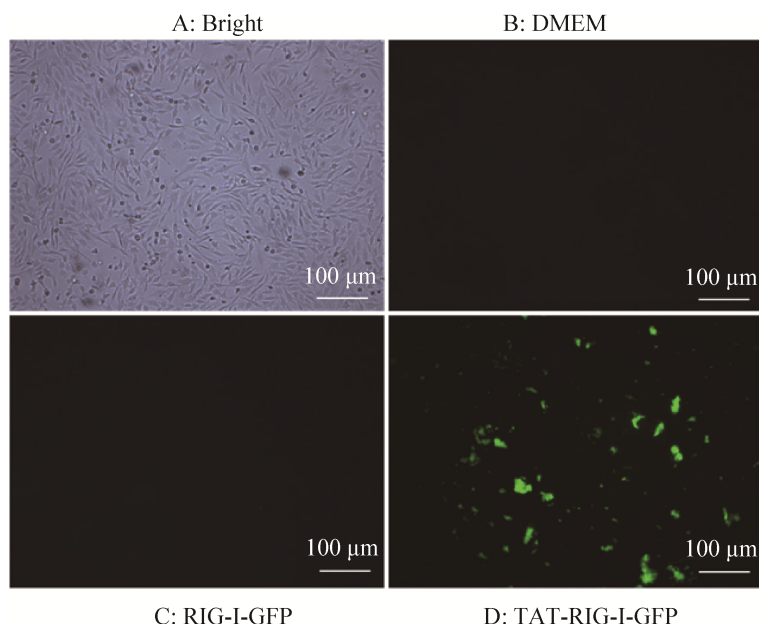


图 4 DF-1 细胞不同组别处理的荧光显微观察 (200×)

Fig. 4 Fluorescence microscopy of different groups in DF-1 cells (200×). (A) Negative (Bright, DF-1). (B) Negative (DMEM). (C) Negative (RIG-I-GFP). (D) Positive (TAT-RIG-I-GFP).

### 3 讨论

*RIG-I* 基因在水禽抗病毒天然免疫反应中发挥识别病毒核酸、激活 I 型 IFN 的重要作用,并可识别内源性 RNA,如 miR-136、miR-145 和内源性逆转录病毒等。此外,*RIG-I* 基因还参与抗菌免疫反应、细胞发育分化等过程<sup>[7-9]</sup>。

在禽类 *RIG-I* 基因的相关研究中发现 AIV、NDV 等感染水禽后主要被 *RIG-I* 基因的受体识别,而该基因在鸡体内缺失,尽管鸡体内的 MDA5 和 LGP2 可以识别某些侵入鸡源细胞的病毒,但该基因在进化过程中受到负向净化选择,因此 *RIG-I* 基因的缺失可能成为鸡对禽流感、新城疫等病毒抵抗力低的主要原因之一<sup>[10]</sup>。研究表明,鸭源 *RIG-I* 基因可在 DF-1 细胞内稳定表达,并显著抑制 AIV 活性<sup>[11]</sup>。利用 Piggy Bac 转座系统可构建稳定表达鸭源 *RIG-I* 基因的鸡传代细胞系,为研究鸡源细胞抗病毒机制提供了良好的模型<sup>[12]</sup>。尽管 *RIG-I* 基因对提高鸡源细胞抗病毒能力的研究已有较大进展,但该蛋白不能进入细胞,导致其在临床上应用受限。TAT 作为研究最多的细胞

穿膜肽,富含碱性氨基酸残基的结构特性使其具有较高正电荷,能与细胞表面带负电荷的分子结合,并激活携带 TAT 的肽或蛋白质经细胞摄取和体内逃逸进入细胞质<sup>[13-14]</sup>。TAT 不仅可与抗体或功能性蛋白质结合进入细胞内抑制病毒增殖,还可以与抗原结合以增强其免疫性<sup>[15-17]</sup>。与其他转运载体相比,TAT 跨越生物膜的转运效率较高,且不受所携带的物质大小影响,可转导分子量超过 100 kDa 的蛋白,且不会改变所携带蛋白的活性和功能,更不会改变原有的细胞基因组结构。TAT 以其无细胞毒性和优异的生物安全特性,而成为新型黏膜免疫佐剂和治疗性蛋白质药物的研究热点<sup>[18-19]</sup>。

此外,GFP 作为报告基因,因其荧光信号稳定、生物安全性好、便于观察和检测等优势,被广泛用于分子标记、药物筛选和融合抗体等研究。

本研究首次构建了 pET-TAT-RIG-I-GFP 重组表达载体,并在 DE3 中稳定表达,其表达产物(TAT-RIG-I-GFP 融合蛋白)的相对分子质量约为 130 kDa,与预期的结果一致。经过纯化和脱盐处理,其能够进入 DF-1 细胞,并在荧光显微镜下观察到其细胞内具有明显的绿色荧光,而未携带 TAT

的 RIG-I-GFP 融合蛋白则不能进入 DF-1 细胞。这表明, TAT 在跨膜递送过程中发挥了关键作用。

下一步的工作重点是对构建的携带有 TAT 的表达蛋白及其抗病毒的生物学活性进行系统性的研究, 进而为家禽的抗病毒药物筛选和转基因抗禽流感品种鸡的培育奠定良好的基础。

## REFERENCES

- [1] Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, et al. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 2015, 32: 48–53.
- [2] Chen Y, Zhang Y, Huang ZY, et al. Molecular characterization, expression patterns, and subcellular localization of RIG-I in the Jinding Duck (*Anas platyrhynchos domesticus*). *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 766–771.
- [3] Fu GH, Chen CT, Huang Y, et al. Comparative analysis of transcriptional profiles of retinoic-acid-induced gene I-like receptors and interferons in seven tissues from ducks infected with avian Tembusu virus. *Arch Virol*, 2016, 161(1): 11–18.
- [4] Barber MRW, Aldridge JR Jr, Fleming-Canepa X, et al. Identification of avian RIG-I responsive genes during influenza infection. *Mol Immunol*, 2013, 54(1): 89–97.
- [5] He HC, Liu ST, Pan JR, et al. Possible mechanism of transmembrane of TAT-PTD fusion protein. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2006, 22(9): 704–710 (in Chinese). 何火聪, 刘树滔, 潘剑茹, 等. TAT-PTD 融合蛋白可能存在的跨膜递送作用机制. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(9): 704–710.
- [6] Wu YH, Ren CH, Gao Y, et al. A novel method for promoting heterologous protein expression in *Escherichia coli* by fusion with the HIV-1 TAT core domain. *Amino Acids*, 2010, 39(3): 811–820.
- [7] Zeng M, Hu ZP, Shi XL, et al. MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses. *Science*, 2014, 346(6216): 1486–1492.
- [8] Karlsen TA, Brinchmann JE. Liposome delivery of microRNA-145 to mesenchymal stem cells leads to immunological off-target effects mediated by RIG-I. *Mol Ther*, 2013, 21(6): 1169–1181.
- [9] Zhao LZ, Zhu JP, Zhou HB, et al. Identification of cellular microRNA-136 as a dual regulator of RIG-I-mediated innate immunity that antagonizes H5N1 IAV replication in A549 cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 14991.
- [10] Liu YR. Neutral selection analysis and genetic differentiation analysis of coding sequence of MDA5 and LGP2 in chickens [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese). 刘怡然. 鸡 MDA5、LGP2 基因编码区的中性选择分析与遗传分化分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [11] Zhang YC, Hu WJ, Wang JC, et al. Detection of RIG-I expression in duck tissues and its anti-avian influenza virus activity *in vitro*. *Chin J Prev Vet Med*, 2013, 35(12): 955–959 (in Chinese). 张雅春, 胡卫杰, 王建超, 等. 鸭 RIG-I 基因的组织表达及体外抗禽流感病毒活性研究. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(12): 955–959.
- [12] Hu Y, Sun YY, Wang XX, et al. Construction of chicken embryo fibroblast cell line DF-1 stably expressing goose RIG-I through piggyBac transposon system. *Chin J Anim Infect Dis*, 2014, 22(3): 53–60 (in Chinese). 胡跃, 孙英杰, 王晓旭, 等. 利用 PiggyBac 转座系统构建稳定表达鹅 RIG-I 的 DF-1 细胞系. *中国动物传染病学报*, 2014, 22(3): 53–60.
- [13] Kim JS, Choi DK, Park SW, et al. Quantitative assessment of cellular uptake and cytosolic access of antibody in living cells by an enhanced split GFP complementation assay. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(4): 771–777.
- [14] Milech N, Longville BAC, Cunningham PT, et al. GFP-complementation assay to detect functional CPP and protein delivery into living cells. *Sci Rep*, 2015, 5: 18329.
- [15] Zhang XM, Jing J, Li WL, et al. Porcine Mx1 fused to HIV Tat protein transduction domain (PTD) inhibits classical swine fever virus infection *in vitro* and *in vivo*. *BMC Vet Res*, 2015, 11: 264.
- [16] Kim HJ, Kim MH, Kim JT, et al. Intracellular transduction of TAT-Hsp27 fusion protein enhancing cell survival and regeneration capacity of cardiac stem cells in acute myocardial infarction. *J Control Release*, 2015, 215: 55–72.
- [17] Li LL, Guo YT, Li ZL, et al. Protein transduction domain can enhance the humoral immunity and cross-protection of HPV16L2 peptide vaccines. *Biomed Rep*, 2016, 4(6): 746–750.
- [18] Van Den Berg A, Dowdy SF. Protein transduction domain delivery of therapeutic macromolecules. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 888–893.
- [19] Shim BS, Cheon IS, Lee E, et al. Development of safe and Non-Self-immunogenic mucosal adjuvant by recombinant fusion of cholera toxin A1 subunit with protein transduction domain. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 9830701.

(本文责编 郝丽芳)